

Einfluß elektromagnetischer Felder auf menschliche Lymphozyten

Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereichs

Bio- und Geowissenschaften,

Landschaftsarchitektur

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Alexandra Antonopoulos

aus München

Juli 2003

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden in der Abteilung für Genetik der Universität Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. G. Obe
2. Gutachter: Prof. Dr. W. Müller

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. W. Trautmann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.2003

Inhaltsverzeichnis

<u>1</u>	<u>Einleitung</u>	7
<u>1.1</u>	<u>Elektromagnetische Felder (EMF)</u>	7
<u>1.1.1</u>	<u>Niederfrequente elektromagnetische Wechselfelder</u>	8
<u>1.1.1.1</u>	<u>Elektrische Felder</u>	9
<u>1.1.1.2</u>	<u>Magnetische Felder</u>	9
<u>1.2</u>	<u>Epidemiologische Studien</u>	9
<u>1.3</u>	<u>Der Zellzyklus</u>	10
<u>1.4</u>	<u>Bedeutung von Calcium für zelluläre Funktionen wie den Zellzyklus</u>	11
<u>1.4.1</u>	<u>Chemie des Calciums</u>	11
<u>1.4.2</u>	<u>Physiologie des Calciums</u>	11
<u>1.4.3</u>	<u>Calciumaufnahme in die Zelle</u>	12
<u>1.4.3.1</u>	<u>Calcium-Kanäle</u>	12
<u>1.4.3.2</u>	<u>Natrium/Calcium-Austauschersystem</u>	13
<u>1.4.3.3</u>	<u>Ca-ATPase</u>	13
<u>1.4.4</u>	<u>Calciumtransportierende Systeme in intrazellulären Membranen</u>	14
<u>1.4.4.1</u>	<u>Endoplasmatisches Retikulum (ER)</u>	14
<u>1.4.4.2</u>	<u>Mitochondrien</u>	14
<u>1.4.5</u>	<u>Calciumbindende Proteine</u>	14
<u>1.4.6</u>	<u>Wechselwirkungen mit anderen Ionen</u>	15
<u>1.4.7</u>	<u>Calcium und Zellteilung</u>	15
<u>1.5</u>	<u>Calcium und EMF</u>	16
<u>1.6</u>	<u>Ziele der Arbeit</u>	17
<u>2</u>	<u>Material und Methoden</u>	18
<u>2.1</u>	<u>Versuche zum Einfluß von EMF auf das Teilungsverhalten von Lymphozyten</u>	18
<u>2.1.1</u>	<u>Blutkulturen</u>	18
<u>2.1.2</u>	<u>Chromosomenpräparation</u>	18
<u>2.1.3</u>	<u>Färbung der Präparate</u>	19

2.1.4	<u>Auswertung</u>	19
2.1.5	<u>Befeldung</u>	20
2.1.6	<u>Befeldungsgeräte</u>	20
2.1.7	<u>Behandlung mit Calciumantagonisten</u>	23
2.1.8	<u>Statistische Analyse</u>	23
2.2	<u>Versuche zum Einfluß von EMF auf den Calciumhaushalt einzelner Zelle</u> ..	24
2.2.1	<u>Zellpräparation</u>	24
2.2.2	<u>Fura - 2 Meßtechnik</u>	24
2.2.2.1	<u>Eigenschaften des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2</u>	24
2.2.2.2	<u>Zwei-Wellenlängen-Messung mit Fura-2</u>	26
2.2.3	<u>Versuchsaufbau</u>	27
2.2.3.1	<u>Verwendete Geräte</u>	27
2.2.3.2	<u>Versuchskammer</u>	28
2.2.3.3	<u>Intracellular Ca²⁺ Measurement System (ICMS)</u>	28
2.2.3.4	<u>Auswertung der ICMS-Bilder am PC</u>	29
2.2.4	<u>Versuchsdurchführung</u>	29
2.3	<u>Versuche zum Einfluß von EMF auf den Calciumhaushalt von Zellpopulationen</u>	30
2.3.1	<u>Zellpräparation</u>	30
2.3.2	<u>Versuche mit dem DRFS - Differential Ratiometric Fluorescence Spectroscopy</u> ..	31
2.3.2.1	<u>Simultanmessung (Real-Time-Exposure) mit dem Spectrofluorimeter</u>	31
2.3.2.2	<u>Nichtmetallischer, thermoregulierter Küvettenständer</u>	34
2.3.2.3	<u>Nichtmagnetischer Rührer</u>	35
2.3.2.4	<u>Befeldung</u>	36
2.3.2.5	<u>Quantifizierung der Magnetfeldeinflüsse</u>	37
2.3.3	<u>Experimente zum Einfluß von Magnetfeldern</u>	38
2.3.4	<u>Experimente mit dem Calcium-Antagonisten Nifedipin</u>	40
3	<u>Ergebnisse</u>	41
3.1	<u>Einfluß elektromagnetischer Felder auf das Teilungsverhalten von Lymphozyten</u>	41
3.1.1	<u>Einfluß auf das Wachstum von Lymphozyten in Vollblutkulturen</u>	41
3.1.2	<u>Einfluß elektromagnetischer Felder in Kombination mit Calciumantagonisten</u> ...	51
3.2	<u>Versuche zum Einfluß von EMF auf den Calciumhaushalt einzelner Zellen</u>	57

<u>3.3</u>	<u>Versuche zum Einfluß von EMF auf den Calciumhaushalt von Zellpopulationen</u>	58
<u>3.3.1</u>	<u>Einfluß von EMF auf den Calcium-Influx</u>	58
<u>3.3.2</u>	<u>Einfluß von EMF in Verbindung mit dem Calciumantagonisten Nifedipin</u>	60
<u>4</u>	<u>Diskussion</u>	61
<u>4.1</u>	<u>Untersuchungsergebnisse</u>	61
<u>4.2</u>	<u>Wirkungsmodelle</u>	65
<u>4.2.1</u>	<u>- "Ion Cyclotron Resonance" Modell</u>	65
<u>4.2.2</u>	<u>- "Ion Parametric Resonance" Modell</u>	65
<u>4.2.3</u>	<u>- Magnetomechanische Effekte</u>	66
<u>4.2.4</u>	<u>- Zeeman-Stark Modell</u>	66
<u>4.2.5</u>	<u>- Triplet-Triplet- Austausch Modell</u>	66
<u>4.2.6</u>	<u>- Surface Compartment Modell</u>	66
<u>4.2.7</u>	<u>- Nicht lineare Dynamik zellulärer Systeme</u>	67
<u>4.2.8</u>	<u>- "Radical Pair" Mechanismus</u>	67
<u>4.3</u>	<u>Hochfrequenzfelder (HFEMF)</u>	69
<u>5</u>	<u>Zusammenfassung</u>	70
<u>6</u>	<u>Literatur</u>	72

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Befeldungsgeräte (Zellzyklus).....	22
Abb. 2:	Anregungsdiagramme von Fura-2	26
Abb. 3:	DRFS-System (Ca^{2+} -Influx).....	33
Abb. 4:	DRFS-Anlage (Diagramm).....	34
Abb. 5:	Nichtmagnetischer Rührer.	36
Abb. 6:	Diagramm: Simultane (Real-Time) Fura-2/AM Fluoreszenzaufzeichnungen.	38
Abb. 7:	Calcium-Influx in HPL (Versuchsdiagramm)	39
Abb. 8	Anteile (%) von M1, M2 und M3+ in HPL bei 5 mT	43
Abb. 9	Anteile (%) von M1, M2 und M3+ in HPL bei 5 mT für 24 Std.	44
Abb. 10	Anteile (%) von M1, M2 und M3+ in HPL bei 5 mT nach 24 Std.....	45
Abb. 11	Anteile (%) von M1, M2 und M3+ in HPL bei 0,5 mT.....	46
Abb. 12	Anteile (%) von M1, M2 und M3+ in HPL bei 1 mT.....	47
Abb. 13	Anteile (%) von M1, M2 und M3+ in HPL bei 2 mT.....	48
Abb. 14:	Differenzen (Δ) : befeldete und Kontrollkulturen bei 5 mT.	49
Abb. 15:	Differenzen (Δ) : befeldete und Kontrollkulturen bei 2 mT, 1 mT, 0,5 mT.....	50
Abb. 16	Anteile (%) von M1, M2 und M3+ in HPL bei 1 mT, 50 μM Nifedipin	52
Abb. 17	Anteile (%) von M1, M2 und M3+ in HPL bei 1 mT, Nifedipin-Kontrolle.....	53
Abb. 18	Anteile (%) von M1, M2 und M3+ in HPL bei 5 mT, 50 μM Nifedipin	54
Abb. 19	Anteile (%) von M1, M2 und M3+ in HPL bei 5 mT, Nifedipin-Kontrolle.....	55
Abb. 20:	Differenzen (Δ) : befeldete und Kontrollkulturen 5 mT + Nifedipin.	56
Abb. 21:	HPL: Anstieg des intrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in %	57
Abb. 22:	EMF-Effekte auf Mn^{2+} -Influxraten in HPL.	59
Abb. 23:	EMF-und Nifedipin-Effekte auf Mn^{2+} -Influxraten in HPL.....	60

1 Einleitung

1.1 Elektromagnetische Felder (EMF)

EMF finden sich fast überall in unserer Umwelt. Sie treten auf bei der Erzeugung, Verteilung und dem Verbrauch elektrischer Energie sowie ihrer Anwendung in technischen Anlagen, Haushaltsgeräten, Verkehr, Kommunikation sowie in Diagnose und Therapie in der Medizin. Mit dem stetig steigenden Energieverbrauch in den Industrieländern wird diese Tatsache von großen Teilen der Bevölkerung als eine Belastung der Umwelt empfunden, die somit immer mehr ins Licht des öffentlichen Interesses rückt. Hierzu trug besonders die Veröffentlichung "Electrical Wiring Configurations and Childhood Cancer" von Wertheimer und Leeper (1979) bei. In dieser Studie wird berichtet, daß bei Kindern, die nahe einer Überlandleitung oder einer Umspannungsstation leben, ein erhöhtes dosisabhängiges Risiko für eine Leukämieerkrankung vorliegt. Ähnliche Ergebnisse veröffentlichten später auch Savitz et al. (1988), Feychting und Ahlbom (1993 und 1998) und andere.

Seit jeher sind elektromagnetische Strahlungen verschiedenster Art ein Bestandteil der Umwelt des Menschen. In vielen Bereichen hat die industriell-technische Entwicklung allerdings dem vorher schon vorhandenen Strahlungspegel ein erhebliches Quantum an zusätzlicher Strahlung hinzugefügt. So kommen zum natürlichen statischen Magnetfeld der Erde, das in Deutschland etwa 40 μT beträgt, durch technische Einrichtungen ständig neue künstliche Wechselfelder dazu.

Innerhalb des großen Frequenzbereiches der elektromagnetischen Strahlung bestehen enorme Unterschiede sowohl hinsichtlich der physikalischen Eigenschaften der Strahlung als auch in bezug auf die Möglichkeiten ihrer Wirkung auf Lebewesen. Die Aussage "Was natürlich ist, ist dem Menschen zuträglich, was künstlich erzeugt wird, schadet ihm" ist in dieser pauschalen und vereinfachenden Form sicher nicht zutreffend (Leitgeb, 1990).

Wegen der Vielzahl der Wechselwirkungen zwischen elektromagnetischer Strahlung (Befeldung) und Organismen und der Frequenzabhängigkeit möglicher Wirkungsmechanismen ist der Schluß von einem spezifischen Frequenzbereich auf die Situation in einem anderen keine solide Grundlage für wissenschaftliche Aussagen.

Betrachtet man die Wirkungen elektromagnetischer Befeldung auf einen Körper, so ergeben sich vier wichtige Fragen:

- gibt es Schwellenwerte für die Expositionsbedingungen, ab denen biologische Wirkungen einsetzen und somit einen sicheren Bereich unterhalb dieser Werte, wo keinerlei Beeinträchtigungen zu befürchten sind?
- können irreversible Veränderungen auftreten, die sich im Laufe der Zeit zu schwerwiegenden Wirkungen summieren (additiver Effekt) oder tritt eine Wirkung nur bei akuter Befeldung auf?
- gibt es neben der Wirkung konstanter Felder auch solche, die biologisch wirksamere Ein- und Ausschalteffekte bewirken?
- ist eine mögliche Wirkung von der Dosis, das heißt vom Produkt aus Befeldungsintensität und Einwirkungsdauer abhängig?

Letzteres hätte zur Folge, daß ein langer Aufenthalt in schwachen elektromagnetischen Feldern ähnliche Wirkungen hätte, wie die kurzzeitige Einwirkung von starken Feldern.

Die Antwort auf diese Fragen könnte für verschiedene Frequenzbereiche (niederfrequent - hochfrequent) unterschiedlich ausfallen (Leitgeb, 1990).

1.1.1 Niederfrequente elektromagnetische Wechselfelder

Die Versuchsserien dieser Arbeit wurden im Niederfrequenzbereich durchgeführt.

Als "niederfrequent" werden elektromagnetische Wechselfelder mit einer Frequenz bis zu 30 kHz bezeichnet. In diesen Bereich gehören also auch die elektromagnetischen Felder der öffentlichen Stromnetze, deren Frequenz in Europa 50 Hz beträgt.

Die Stromversorgung liefert hier elektrische Energie mit Wechselspannung, das heißt mit elektrischem Strom, der seine Stärke und seine Richtung zeitlich verändert. Die technische Wechselspannung hat einen sinusförmigen Verlauf. Als Frequenz wird die Anzahl der ausgeführten Schwingungen pro Sekunde bezeichnet, die in Hertz (Hz) angegeben wird.

Der Niederfrequenzbereich wird nochmals in folgende Teilbereiche untergliedert:

ULF-Bereich (ultra low frequency): 0 bis 30 Hz,

ELF (extremely low frequency) 30 bis 300 Hz,

VF (voice frequencies) 300 bis 3000 Hz,

VLF (very low frequency) 3000 bis 30 000 Hz.

Die Frequenz des Stromnetzes in Deutschland und im benachbarten Ausland liegt mit 50 Hz im ELF-Bereich.

Bei niederfrequenten elektromagnetischen Feldern können das elektrische und das magnetische Feld getrennt betrachtet werden; die elektrische Feldstärke wird in Volt pro Meter

(V/m) gemessen, die magnetische in Ampère pro Meter (A/m), die magnetische Flussdichte in Tesla (T), als Maß für die Induktion.

Die Schwierigkeiten bei der Erforschung der Wirkung von außen auf den Organismus einwirkender elektromagnetischer Felder bestehen hauptsächlich darin, daß nicht bekannt ist, über welche Mechanismen die Felder auf Zellen und Gewebe Einfluß nehmen und welche Komponenten (die elektrische, magnetische oder beide), für eine Wirkung verantwortlich sind.

1.1.1.1 Elektrische Felder

Elektrische Wechselfelder hoher Feldstärke verursachen im menschlichen Körper Leitungsströme, die über die leitfähigsten Wege im Körper, die Blutbahnen und über die Körperflüssigkeit, den Körper in Feldrichtung durchqueren. Bei niedrigen Feldstärken kann man davon ausgehen, daß das elektrische Feld in der Körperoberfläche eine verhältnismäßig leitfähige Kontur vorfindet und somit kaum in den Körper eindringt.

Statische elektrische Felder haben für die Problematik der Wirkungen auf den Organismus keine große Bedeutung, da sie technologisch bedingt selten zum Einsatz kommen. Dort wo sie eingesetzt werden, können sie relativ einfach durch entsprechende Schutzmaßnahmen abgeschirmt werden (Kieback, 1990).

1.1.1.2 Magnetische Felder

Anders als die elektrischen Felder durchdringen magnetische Felder das Körperinnere und könnten somit direkt biologische Funktionen beeinflussen. Über Induktionsvorgänge können sie mit ionalen Vorgängen in den Zellen und an der Membran in Wechselwirkung treten.

1.2 Epidemiologische Studien

Die Problematik einer möglicherweise schädlichen Auswirkung elektromagnetischer Felder auf den Menschen wurde zum ersten mal 1979 aufgeworfen, als Wertheimer und Leeper ihre aufsehenerregende Studie "Electrical Wiring Configurations and Childhood Cancer" veröffentlichten. Sie beschrieben in dieser Publikation einen Zusammenhang zwischen Krebserkrankungen bei Kindern und Freileitungen. Je näher die Kinder an Strom-Überlandleitungen oder Umspannstationen lebten, um so höher war ihr Risiko, an Leukämie zu erkranken. Ähnliche Ergebnisse veröffentlichten später auch Savitz et al. (1988), Feychting et al. (1993 und 1998) und andere. Fulton (1980) dagegen fand bei einer Untersuchung von

Leukämiefällen bei Kindern auf Rhode Island keinen Zusammenhang mit EMF. Tomenius (1986) hingegen beobachtete einen Zusammenhang mit Gehirntumoren, jedoch nicht mit Leukämie. 1983 veröffentlichten Nordström et al. eine Studie über eine vermehrte Zeugungsunfähigkeit bei Arbeitern in Hochspannungswerken und über ein gehäuftes Auftreten von Mißbildungen bei Kindern eben dieser Arbeiter. Milham (1988) beobachtete eine signifikant erhöhte Mortalitätsrate infolge akuter myeloischer Leukämie bei Amateurfunkern in Amerika. Bei einer Studie mit Kontrollgruppe und verschiedenen Feldexpositionen untersuchten Demers et al. (1991) die Entwicklung von Brusttumoren bei Männern. Die Autoren errechneten aus den gewonnenen Daten 1,8 bis 6-fach erhöhte Risiken für eine Erkrankung je nach Exposition. In Schweden und Finnland durchgeführte Studien über EMF-Exposition am Arbeitsplatz zeigten ebenfalls ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für Leukämie (Floderus et al., 1993; Nordenson et al., 2001).

Tumorzellen zeigen im Endstadium gegenüber gesunden Zellen ein verändertes Teilungsverhalten. Bei vermuteter Tumorinduktion durch EMF war es daher notwendig, deren Einfluß auf den Zellzyklus zu untersuchen (Cohen et al., 1990).

1.3 Der Zellzyklus

Der Zellzyklus somatischer Zellen gliedert sich in zwei Hauptphasen: Interphase und Zellteilung (Mitose). Als Interphase bezeichnet man die Zeit zwischen zwei Teilungsphasen. In diesem Stadium befindet sich die Zelle in höchster Aktivität und die Chromosomen sind dekontensiert. Die Interphase besteht aus drei Abschnitten.

- Die G_1 - bzw. G_0 -Phase ist zeitlich sehr variabel. Bei Zellen, die sich über einen längeren Zeitraum nicht teilen, ist sie entsprechend lang und wird dann als G_0 -Phase bezeichnet. In der G_1 -Phase finden Proteinbiosynthese und RNA-Synthese statt. Mit der intensiven Synthese zelleigener Proteine ist ein Zellwachstum verbunden. In diesem Stadium ist der Chromosomensatz diploid mit aus einer Chromatide bestehenden Chromosomen.
- Die S-Phase zeichnet sich durch eine relativ konstante Dauer von 7 bis 8 Stunden aus. In dieser Synthesephase wird die DNA repliziert, so daß jedes Chromosom aus zwei Chromatiden besteht, die im kondensierten Zustand lichtmikroskopisch sichtbar sind.
- Die G_2 -Phase bietet der Zelle Gelegenheit, eventuelle Fehler in der DNA zu reparieren, bevor es zur Zellteilung kommt.

Die folgende Mitose selbst gliedert sich in vier Abschnitte:

- In der Prophase kondensieren die Chromosomen, die jetzt lichtmikroskopisch sichtbar sind. Ferner wandern die Zentriolen zu den beiden Zellpolen und bestimmen so die Lage der Teilungsebene. Kernmembran und Nucleoli lösen sich auf.
- In der Metaphase setzen die Spindelfasern des Spindelapparates an den Kinetochoren im Bereich der Centromere an und ordnen so die Chromosomen in der Teilungsebene an.
- In der Anaphase werden die Kinetochoren in Längsrichtung geteilt und die beiden Chromatiden durch Verkürzung der Spindelfasern voneinander getrennt und jeweils zu einem Pol gezogen. An den beiden Zellpolen befindet sich jetzt ein diploider Chromosomensatz mit wieder nur je einer Chromatide.
- In der abschließenden Telophase werden neue Kernmembranen gebildet. Anschließend teilt sich die gesamte Zelle (Cytokinese) und neue Nucleoli entstehen. Die Chromosomen decondensieren wieder.

Dieser kurze Überblick über den Ablauf des Zellzyklus berücksichtigt nicht die Regulation dieses Vorgangs über Proteine und Proteinkinasen. Eine ausführliche Darstellung dieser Aspekte würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen.

1.4 Bedeutung von Calcium für zelluläre Funktionen wie den Zellzyklus

1.4.1 Chemie des Calciums

Bei Calcium handelt es sich um ein Erdalkalimetall mit einem Molekulargewicht von 40.08 und einer Wertigkeit von +2. Es gehört zu den am häufigsten Elementen und kommt in der Natur meist als schwer- oder unlösliche Verbindung vor (z.B. Carbonat).

1.4.2 Physiologie des Calciums

Die physiologische Bedeutung von Ca^{2+} für den Organismus ist immens. So bildet Calcium die wichtigste Gerüstsubstanz für den Knochenaufbau; weitere Funktionen bestehen bei der Blutgerinnung, Sekretion, Muskelkontraktion und Zellteilung. Eine bedeutende Funktion kommt Ca^{2+} auch bei der intrazellulären Signaltransduktion zu.

In der extrazellulären Flüssigkeit beim Menschen liegt die Konzentration des Calciums ($[\text{Ca}]_e$) durchschnittlich bei 2,6 mmol/l. Davon sind 50% ionisiert, der Rest ist an Plasmaproteine

gebunden. Im Zellinneren ($[Ca]_i$) findet man 100-200 nmol/l freies intrazelluläres Calcium, der Anteil des gebunden Calciums in endoplasmatischem Retikulum und Mitochondrien ist abhängig von dem betrachteten Zelltyp.

Muß im Rahmen einer Stimulation calciumabhängiger Zellvorgänge die intrazelluläre freie Calciumkonzentration erhöht werden, so kann dies über eine Calciumeinschleusung aus dem Extrazellulärraum erfolgen oder aus intrazellulären Speichern bewirkt werden. Die Änderungen des intrazellulären Calciumspiegels haben transienten Charakter, wobei der Zeitverlauf von Zelltyp zu Zelltyp variiert.

Die Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration übernimmt die Zelle weitgehend selbst durch Hemmung oder Aktivierung ihrer eigenen Calciumspeicher in Mitochondrien und endoplasmatischem Retikulum. Darüber hinaus verfügt die Zelle über verschiedene calciumtransportierende Systeme in der Plasmamembran (Ca-ATPase, Ca-Kanäle, Na/Ca-Austauschersysteme), die in die Regulation der intrazellulären freien Calciumkonzentrationen eingreifen können. Auch über calciumbindende Proteine wie Calmodulin kann die intrazelluläre freie Calciumkonzentration moduliert werden. Die Regulation der extrazellulären Calciumkonzentration wird von Hormonen gesteuert.

1.4.3 Calciumaufnahme in die Zelle

1.4.3.1 Calcium-Kanäle

Die ersten Calcium-Kanäle wurden 1958 in den Muskelfasermembranen von Flußkrebse entdeckt (Fatt et al., 1958). Im Laufe der Zeit wurden an vielen erregbaren und nicht erregbaren Zellen Calcium-Kanäle nachgewiesen. Dabei variiert die Anzahl der Kanäle sehr stark von Zelltyp zu Zelltyp. Werden die Kanäle von einem elektrischen Membranpotential geöffnet, strömen etwa 3×10^6 Calciumionen pro Sekunde in die Zelle ein (Kostyuk, 1981).

Die Selektivität der Kanäle ist nicht absolut, so werden Barium und Strontium gegenüber Calcium bevorzugt transportiert. Nach den Untersuchungen von Kostyuk (1981) besitzen die Calciumkanäle einen "Selektivitätsfilter", der für die Ausschleusung monovalenter Kationen verantwortlich ist. Wenn dieser Filter nicht mehr intakt ist, kann Natrium einströmen.

Ca^{2+} -Kanäle können durch spezifische organische Verbindungen blockiert werden. Tertiäre Amine (Verapamil und Diltiazem) können die Kanäle von innen blockieren (Lee et al. 1983), diese Effekte sind spannungs- und anwendungsabhängig. Die vielfach als "Calciumblocker" verwendeten Dihydropyridine (Nifedipin) zeigen kein spannungsabhängiges Verhalten,

obwohl ihre Hemmkraft vom Membranpotential abhängt (Beam, 1984). Nifedipin blockiert die Kanäle von der Lipidphase der Plasmamembran aus, denn ihr Effekt ist entscheidend von den lipophilen Eigenschaften der Membran abhängig (Kokubun et al., 1984). Ein wichtiger Aspekt der Calciumkanäle ist deren Selektivität für adrenerge Neurotransmitter. c-AMP oder die katalytische Untereinheit der c-AMP-abhängigen Proteinkinase verstärken die Öffnung entsprechender Calciumkanäle (Reuter et al., 1982).

Es gibt mehrere Typen von Calciumkanälen, die verschiedene Eigenschaften besitzen. Dabei wird zwischen spannungsabhängigen, rezeptorabhängigen, Second-Messenger-abhängigen, mechanisch gesteuerten, tonisch aktivierbaren Calciumkanälen und Gap-Junction-abhängigen Calciumkanälen unterschieden (Tsien et al., 1990).

1.4.3.2 Natrium/Calcium-Austauschersystem

Dieses System findet sich in erster Linie in erregbaren, aber auch in manchen nichterregbaren Plasmamembranen. Die Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration oder die Erniedrigung der extrazellulären Natriumkonzentration führt zu einem Calciumeinstrom. Die physiologische Funktion dieses Systems ist die Kontrolle der freien intrazellulären Calciumkonzentration. Die Energie für den Austausch von 3 Na⁺ gegen 1 Ca²⁺ stammt nach Untersuchungen von Reuter (1985) vom hohen elektrochemischen Natriumgradienten (extrazellulär: 140 mM; intrazellulär: 6 mM).

1.4.3.3 Ca-ATPase

Das dritte calciumtransportierende System der Plasmamembran ist eine spezifische ATPase, die Calcium aus der Zelle schleust. Sie gehört zu den sogenannten "E₁/E₂-Transport-ATPasen", was bedeutet, daß die Ca-ATPase in zwei verschiedenen Konformationsformen vorliegt und die Energie in Form von intrazellulärem Aspartylphosphat bezieht. Eine wichtige Eigenschaft dieser Ca-ATPase ist ihre direkte Stimulierbarkeit mit Calmodulin (Jarrett et al., 1977), wobei die Affinität zum Calcium und die maximale Transportrate gesteigert werden kann. Bei der Ca-ATPase handelt es sich um ein einzelnes Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 138000 D, das zahlreichen hormonellen Beeinflussungen unterliegt (Galo et al., 1981).

1.4.4 Calciumtransportierende Systeme in intrazellulären Membranen

1.4.4.1 Endoplasmatisches Retikulum (ER)

Das ER akkumuliert Calcium mit Hilfe einer spezifischen ATPase, die ebenfalls wie die der Plasmamembran zu den "E₁/E₂-Transport-ATPasen" gehört. Das Enzym zeigt eine hohe Affinität zu Calciumionen und konzentriert große Mengen Calcium in isolierten Retikulumvesikeln. Die Freisetzung von Calcium aus dem ER geschieht unter der Beteiligung von Phosphoinosiden. Ausgangspunkt für diese Entdeckung bildete die experimentelle Beobachtung, daß nach einer Agonist induzierten Stimulation der Enzymsekretion im Pankreas ein verstärkter Phosphateinbau in Phospholipide zu beobachten war (Hokin et al., 1958). Später wurde ein spezieller Phosphatidylinositol-Phosphatidat-Zyklus vorgeschlagen (Hokin, 1967), der einen Abbau von Phosphatidylinositol zu Diacylglycerol postulierte. Michell (1975) beobachtete, daß die intrazelluläre Calciumfreisetzung über den Abbau von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) vorbereitet wird und Streb (Streb et al., 1984) konnte an permeabilisierten Pankreaszellen zeigen, daß bei PIP₂-Abbau 1,3,5-Inositol-triphosphat (IP₃) entsteht, welches bei exogener Zugabe ebenfalls in der Lage ist, aus nichtmitochondrialen Speichern Calcium freizusetzen.

1.4.4.2 Mitochondrien

Lange Zeit hat man Mitochondrien als wichtigste Regulatoren des intrazellulären Calciumgehalts angesehen. Doch stellte sich bald heraus, daß die Mitochondrien als cytosolische Calciumpuffer überschätzt wurden, denn die kinetischen Daten der Calciumaufnahme von Mitochondrien ergab, daß die Affinität zu Calcium für eine regulatorische Rolle ungenügend ist (Tsien, 1990).

1.4.5 Calciumbindende Proteine

Die calciumbindenden Proteine lassen sich in zwei Gruppen einteilen:

- in der Membran verankerte Proteine. Sie kontrollieren die Passage von Calcium in das Cytoplasma und aus dem Cytoplasma und in das Innere intrazellulärer Calciumspeicher. Hierzu gehören die bereits erwähnten Proteine, die eine Calciumaufnahme und -abgabe in Calciumkanälen und im Na/Ca-Austauschersystem regulieren, sowie die Calcium-ATPase und die calciumtransportierenden Systeme in ER und Mitochondrien.

- im Cytosol gelöste Proteine. Diese sind wichtig für die Kontrolle der intrazellulären Calciumkonzentration, haben jedoch nur eine begrenzte Bindungskapazität. Weitere Funktionen sind die Modulation der vom Calciumsignal verursachten Effekte. Zu dieser Gruppe gehören etwa Troponin, Calmodulin, Parvalbumin, Synexin, Calbindin, Calcyclin.

1.4.6 Wechselwirkungen mit anderen Ionen

Wegen der chemischen Ähnlichkeit mit anderen Erdalkali-Elementen ist eine Wechselwirkung des Calciumions mit Lithium, Natrium, Kalium, Mangan und Magnesium möglich. Dazu zählen etwa die Besetzung von Calciumbindungsstellen an Enzymen mit anderen Ionen. Diesen Effekt nutzt man bei Calciumkonzentrationsmessungen in Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen, wobei extrazelluläres Calcium durch Mangan ersetzt wird (Merritt et al., 1989).

1.4.7 Calcium und Zellteilung

Die Zellteilung in Lymphozyten erfolgt nach Zugabe eines Mitogens normalerweise nach etwa 48 Stunden. Während Antigene nur eine kleine Anzahl von Zellen von G_0 nach G_1 bringen, stimulieren polyklonale Mitogene die meisten Zellen einer Lymphozytenpopulation. Sowohl die antigengesteuerte, als auch die polyklonale Stimulation werden mittels Bindung von Lektinen an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Lymphozyten angeregt und ziehen eine Kaskade biochemischer Reaktionen nach sich, die in einer Mitose enden.

Da für eine Lektin-induzierte Mitose Calcium notwendig ist, geht man davon aus, daß Calcium für die Bindung des Lektins an die Membran und daran anschließende Prozesse notwendig ist. Die Daten sind hierzu allerdings uneinheitlich. So wurde in Studien über die Wechselwirkung von Phytohaemagglutinin (PHA) -bindungen an menschliche Lymphozyten (Whitney et al., 1973) kein unbedingt notwendiger Calciumbedarf festgestellt. Andere Studien unter ähnlichen Bedingungen deuten jedoch auf das Gegenteil hin (Kay, 1971). Hinweise, die auf eine Signalwirkung cytoplasmatischen Calciums hindeuten wurden aus Versuchen mit radioaktiv markiertem Calcium an Mitogen-stimulierten Lymphozyten gewonnen. Studien, bei denen sowohl markiertes, von außen einströmendes Calcium als auch der gesamte Calciumgehalt der Zellen gemessen wurden deuten darauf hin, daß die extrazelluläre Aufnahme von markiertem Calcium ein Austauschprozess ist, bei dem sich der Gesamtcalciumspiegel der Zelle kaum ändert (Lichtman et al., 1979 und 1980). Diese Befunde weisen darauf hin, daß Mitogene den

Austausch von extrazellulärem Calcium mit dem von intrazellulären Calciumspeichern fördern. Dieser Calciuminflux könnte von einer erhöhten Permeabilität der Plasmamembran nach Lektinbindung hervorgerufen werden (Segel et al., 1979).

Weitere Versuche, die für eine mitoseregulierende Rolle von Calcium sprechen, wurden mit dem Calcium Ionophor A23187 durchgeführt. Dieses steigert die Permeabilität biologischer Membrane für Kationen. Zwei Ionophormoleküle binden ein Calciummolekül und dieser Komplex kann die Membran ungehindert durchqueren (Reed et al., 1972; Chaney et al., 1974). Das Ionophor bindet jedoch nicht nur selektiv an Calcium; es bindet ebenso gut an Magnesium und Mangan, sogar mit höherer Affinität. Weil A23187 die Thymidin-Aufnahme stimuliert, die allgemein als Zeichen für einen Mitosebeginn gewertet wird, werden die oben aufgeführten Daten als Beweis dafür gewertet, daß Calciuminflux im Zusammenhang mit Lektinbindung mitogen wirken kann. Das Ionophor ist als Stimulans der DNA-Synthese nicht so effektiv wie Lektine, was jedoch auf cytotoxischen Effekten beruhen könnte. Abhängig von der Konzentration kann A23187 nämlich zu Calciumüberladung der Zelle und zu Zelllysis führen.

1.5 Calcium und EMF

Verschiedene Arbeiten weisen darauf hin, daß EMF die Ca^{2+} Regulation in Zellen ändern und über diesen Mechanismus die Zellproliferation beeinflussen könnten. Es wurde gezeigt, daß EMF-Signale, die in Stärke und Pulsfrequenz identisch waren mit den Signalen, die eine PHA-stimulierte DNA-Synthese in Lymphozyten inhibierten (Conti et al., 1983; Mooney et al., 1986) ebenfalls die PHA-abhängige Ca^{2+} -Aufnahme in diesen Zellen inhibierten (Conti et al., 1983 und 1985). Bei nicht stimulierten G_0 -Lymphozyten war die Ca^{2+} -Aufnahme nicht betroffen. Im Gegensatz dazu modulierten die gleichen EMF-Signale in Mitogen-stimulierten Zellen sehr effektiv die Ca^{2+} -Aufnahme und die DNA-Synthese (Conti et al., 1983; Mooney et al., 1986; Cossarizza et al., 1989; Walleczek et al., 1990).

Weiterhin deuten die Daten darauf hin, daß Zellen mit erniedrigter Mitogen-induzierter Ca^{2+} -Aufnahme stärker auf EMF Einflüsse reagieren als Zellen mit einer normalen Ca^{2+} -Reaktion nach Mitogengabe (Cossarizza et al., 1989). Diese Beobachtung stimmt auch mit den Befunden überein, daß eine EMF-induzierte Ca^{2+} -Aufnahme in den Zellen stärker ist, die vorher auf eine Con A Stimulation kaum reagiert haben (Walleczek et al., 1990).

1.6 Ziele der Arbeit

Diese Arbeit wurde unter dem Aspekt durchgeführt, daß Hinweise aus der Literatur vorlagen, die auf einen Einfluß von EMF auf das Wachstumsverhalten menschlicher Zellen hindeuteten. Dies war, neben reinen Befeldungsversuchen, ebenfalls der Fall bei Kombinationsversuchen von EMF und Vorbehandlung mit chemischen Mutagenen (Rosenthal et al., 1989). In dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob auch eine Behandlung mit EMF einen stimulierenden oder inhibierenden Einfluß auf menschliche Lymphozyten ausübt. Sollte sich ein Effekt zeigen, sollten mögliche Ursachen hierfür gesucht werden. Hierfür war Calcium als wichtiger Signalgeber für die Zellteilung zu sehen, zumal auch hier Literaturhinweise vorlagen (Walleczek et al., 1990).

2 Material und Methoden

2.1 Versuche zum Einfluß von EMF auf das Teilungsverhalten von Lymphozyten

2.1.1 Blutkulturen

Die Proliferationsversuche mit humanen peripheren Lymphozyten (HPL) wurden mit Vollblutkulturen durchgeführt. Das Blut stammte von gesunden Spendern beiderlei Geschlechts und wurde vom Blutspendedienst des Universitätsklinikums Essen zur Verfügung gestellt. Der Transport des Blutes erfolgte in sterilen Natrium-Heparin-beschichteten Röhrchen.

Die Kulturen wurden, wiederum unter sterilen Bedingungen, in 10 ml-Kulturröhrchen angesetzt. Es handelte sich jeweils um 5 ml-Kulturen, die sich wie folgt zusammensetzten:

- 4 ml Mc Coy's 5A Medium (mit 400 I.E. Penicillin und 0,5 mg Dihydrostreptomycin)
- 0,5 ml fötales Kälberserum (FKS)
- 0,12 ml Phytohämagglutinin (PHA)
- 0,1 ml 5-Bromodeoxyuridin (BrdUrd) \equiv Endkonzentration 2×10^{-5} M
- 0,5 ml Vollblut

Die Kultivierung erfolgte in Präzisionswasserbädern (Haake D8-6P) bei 37°C und wurde nach jeweils 48, 52, 56, 60 oder 64, und 68 Stunden abgebrochen. Zwei Stunden vor diesem Aufarbeitungsschritt wurde den entsprechenden Kulturen 0,08 µg/ml Colcemid zugegeben, um die sich zu diesem Zeitpunkt in Teilung befindlichen Zellen im Mitosestadium zu arretieren. Zu jedem Zeitpunkt wurde jeweils eine exponierte und eine nichtexponierte Kontrollkultur aufgearbeitet.

2.1.2 Chromosomenpräparation

Die Aufarbeitung der Vollblutkulturen erfolgte nicht mehr unter sterilen Bedingungen und bei Raumtemperatur.

Nach einem ersten Zentrifugationsschritt (900 U/min) und Abnahme des Mediums wurde das Zellpellet in 5 ml hypotoner Lösung bestehend aus 0,075 M Kaliumchlorid (KCl) resuspendiert. Diese Behandlung dient dem Aufquellen der Lymphozyten und der Zerstören

der Erythrozyten in der Kultur und beträgt 8 - 10 min. Nach erneuter Zentrifugation und Abnahme des Überstands wurden dem Pellet langsam 5 ml eines frisch zubereiteten Fixativs (Methanol:Eisessig = 3:1) zugegeben. Danach wurde wieder abzentrifugiert und das Zellpellet 4 bis 5 mal mit dem Fixiergemisch gewaschen, bevor die Zellen in einer entsprechenden Menge (je nach Pelletgröße 0,5 - 1 ml) Fixativ suspendiert und auf gekühlte Objektträger aufgetropft wurden. Die Objektträger wurden einige Tage bei Raumtemperatur getrocknet, bevor sie weiterbearbeitet wurden.

2.1.3 Färbung der Präparate

Die differenzielle oder Harlekin-Färbung nach Hill und Wolff (1982) beginnt mit einer Photosensibilisierung der DNA über eine Exposition der Chromosomen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258. Diesen 0,45%igen Bisbenzimidfarbstoff läßt man für 20 min auf die Zellen einwirken. Nach dem Spülen der Objektträger in Aqua dest. und Phosphatpuffer (PBS) werden die Präparate, mit einem PBS-Film benetzt und 20 min mit Schwarzlicht (360nm) auf einer Wärmeplatte bei 60°C bestrahlt. Während dieses Behandlungsschrittes werden die Präparate mit einem Objektträger abgedeckt, damit sie nicht austrocknen. Nach dem Entfernen der Objektträger und einem Spülgang mit PBS werden die Präparate in 5%iger Giemsa-Lösung für 10 - 12 min gefärbt. Mit einer weiteren Aqua dest.-Spülung wird überschüssige Farbe entfernt und die Präparate werden anschließend an der Luft getrocknet.

2.1.4 Auswertung

Für die Analyse der Chromosomen wurde ein Mikroskop der Firma Olympus (Typ BH-2) verwendet.

Bei der Auswertung der Metaphasen wurde zwischen ersten (M1), zweiten (M2), dritten und weiteren (M3+) Mitosen unterschieden. Hierzu diente das während der Kultivierung zugegebene Thyminderivat BrdUrd (B), das in der S-Phase anstelle von Thymin (T) in die DNA eingebaut wird. Nach der ersten Replikation sind somit beide DNA-Stränge der Chromatiden je zur Hälfte mit BrdUrd substituiert (TB - TB). In einer zweiten Replikationsrunde enthält der neu synthetisierte Strang wiederum BrdUrd, wodurch aus dem TB der ersten Replikationsrunde zwei Chromatiden mit der Konfiguration TB - BB entstehen. Mit der dritten Replikation steigt die Zahl der in der neu synthetisierten DNA enthaltenen

Derivat-Moleküle, was Chromatiden in der Konfiguration BB - BB und BB - TB zur Folge hat. Der Proliferationsindex (PI) wurde berechnet aus der Anzahl der mitotischen Zellen, die sich in der jeweils ersten, zweiten, dritten oder weiteren Mitose befanden. Der PI gilt als Maß für das Teilungsverhalten der Zellen. Zu seiner Bestimmung werden in 100 Zellen die Anzahl der M1, M2 und M3+ gezählt und der PI wie folgt berechnet:

$$PI = (M1 \times 1) + (M2 \times 2) + (M3+ \times 3)$$

2.1.5 Befeldung

Die Lymphozytenkulturen wurden unterschiedlichen Flußdichten elektromagnetischer Felder (EMF) ausgesetzt. Die untersuchten Feldstärken waren: 0,5, 1, 2 und 5 mT (Tesla) mit einer Exposition während der gesamten Kultivierungszeit. Außerdem wurden Versuche mit unterschiedlichen Expositionszeiten durchgeführt. Dabei wurden die Kulturen nur für die ersten 24 Stunden ihrer Kultivierung einem EMF von 5 mT ausgesetzt oder das Feld wurde erst nach 24 Stunden Inkubationszeit ohne Befeldung zugeschaltet. Zusätzlich zu diesen Feldversuchen wurden Kombinationsversuche mit einem Calciumantagonisten (siehe 2.1.7) durchgeführt.

Alle Versuchsreihen wurden mit 5 verschiedenen Blutproben durchgeführt.

2.1.6 Befeldungsgeräte

Damit eine gleichzeitige Kultivierung EMF-exponierter und nicht-exponierter Zellen und somit vergleichbare Ergebnisse möglich sind, wurden zwei Geräte gebaut, die mit Präzisionswasserbädern (Haake D8-6P) eine konstante Temperatur von $37,0 \pm 0,05^\circ\text{C}$ garantierten. Die für die Regulierung notwendigen Temperaturfühler waren innerhalb der mit Wasser gefluteten Inkubationskammern untergebracht. Zwischen Thermostaten und Inkubationskammern wurde ein Abstand von 0,5 m eingehalten, um einen Einfluß elektromagnetischer Streufelder der Thermostaten so gering wie möglich zu halten. Eine Messung der Streufelder mit einem EMDEX-Meter ergaben Werte von 2,5 μT bei eingeschalteter und 1 μT bei ausgeschalteter Heizröhre. Jedes Gerät konnte 10 Kulturröhrchen aufnehmen (Abb. 1).

Das magnetische Feld wurde, senkrecht zur Achse der Kulturröhrchen, von zwei Helmholtz Spulen mit 60 cm Durchmesser (im Abstand von 20 cm) hergestellt. In ihnen sorgten 100

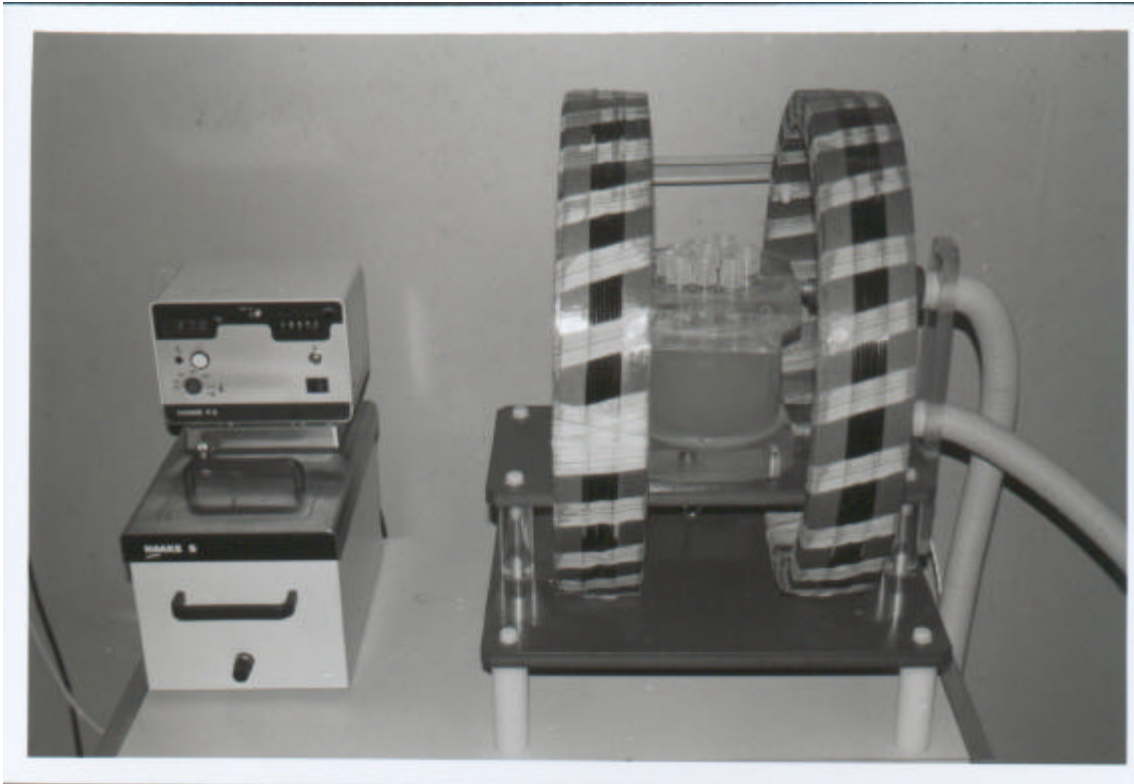
Umwicklungen eines Kupferdrahts (\varnothing 2,5 mm) für einen Widerstand von 1,4 Ω (Ohm) und eine Induktion von 28,6 mH (Henry). Eine magnetische Flußdichte von 5 mT entsprach einem Strom von 17,4 A (Ampere). Die Feldinhomogenität in der "Expositionskammer" wurde mit Hilfe des Bio-Savart-Gesetzes berechnet und betrug weniger als 1%.

Die Stromversorgung der Geräte erfolge über eine normale 230 V Steckdose.

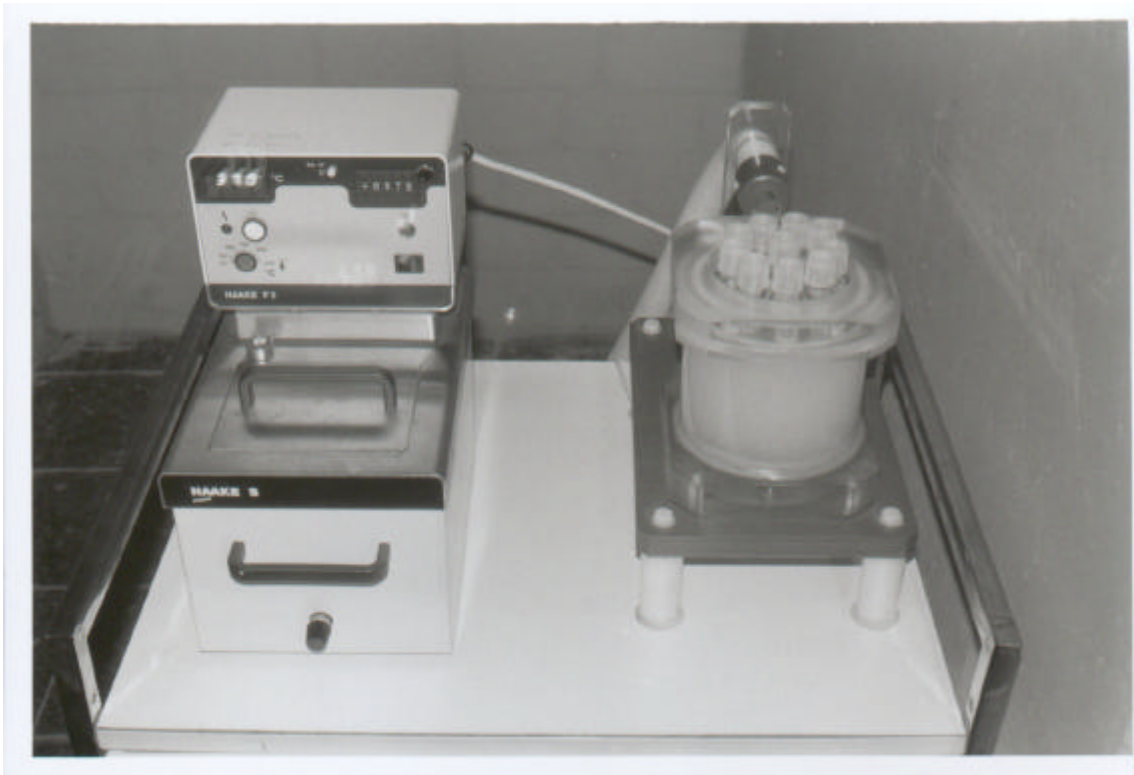
Für das elektrische Feld in den Kulturen wurde ein Wert von 0,0075 V/m errechnet.

Abb. 1: Befeldungsgeräte. Für die exakte Thermoregulierung wurden zwei identische Wasserbäder mit externen Inkubationskammern für jeweils 10 Probenröhrchen gebaut. Temperaturfühler für die Regulierung waren innerhalb der Kammern untergebracht. Die Helmholtzspulen für die Erzeugung der Magnetfelder wurden so positioniert, daß von ihnen hervorgerufene Wärmeeffekte weitgehend ausgeschlossen werden konnten.

(a) Expositions-kammer



(b) Kontrollkammer



2.1.7 Behandlung mit Calciumantagonisten

Für diese Versuchsreihe wurden 20 Vollblutkulturen wie in 2.1.1 beschrieben angesetzt. Zusätzlich wurde bei 10 Kulturen Nifedipin (50 μ M, gelöst in 50%igem Ethanol) zugegeben. Die Zellkulturen teilten sich in folgende Behandlungstypen auf:

- Kontrollen (weder EMF noch Nifedipin)
- nur Nifedipin
- nur EMF von 5 mT
- Kombination von 5 mT EMF und Nifedipin.

Aufarbeitung und Färbung erfolgten nach den schon beschriebenen Methoden. Die Aufarbeitungszeiten waren wiederum 48, 52, 56, 64 und 68 Stunden.

2.1.8 Statistische Analyse

Damit mögliche Effekte erfaßt werden konnten, wurde die Differenz (Δ_{ij}) bezüglich M1, M2 und M3+ zwischen exponierten und nicht-exponierten Zellkulturen für jeden Zeitpunkt (i) und jede Blutprobe (j) berechnet. Da eine beträchtliche Variabilität zwischen den einzelnen Blutproben bezüglich der Zeitabhängigkeit dieses Parameters bestand, wurde ein Modell zur Bestimmung eines zeitabhängigen Effektes verworfen. Stattdessen wurde auf einen allumfassenden, zeitunabhängigen Effekt hin getestet. Die verwendete Formel war $\Delta_{ij} = \mu + \text{Zeit}_i + \text{Subjekt}_j$, wobei Δ_{ij} die Differenz zwischen exponierten und nicht-exponierten Zellen zum Zeitpunkt i und für das Subjekt j (Blutprobe) darstellt; μ repräsentiert den Mittelwert aller Differenzen über die Proben hinweg, während "Zeit" und "Subjekt" die zeit- und subjektbezogenen Effekte beinhalten (Hand und Taylor, 1987). Hierfür getestet wurde die Hypothese $H_0: \mu = 0$. Die für Δ errechneten Verteilungen wurden als "Scatter Plots" dargestellt.

2.2 Versuche zum Einfluß von EMF auf den Calciumhaushalt einzelner Zelle

Die im Folgenden beschriebenen Experimente wurden im Elektrophysiologie-Labor von Priv. Doz. Dr. Meyer an der Universität Bonn durchgeführt

2.2.1 Zellpräparation

Für die folgenden Versuche wurden aus Vollblut isolierte Lymphozyten benötigt. Hierfür wurde das Vollblut mit einer Trennflüssigkeit (Beckton Dickinson) gemischt und, nach dem Absetzen der restlichen Blutbestandteile, die Lymphozyten enthaltende obere Schicht abgenommen und abzentrifugiert. Nach 2 bis 3 Waschschritten in McCoy's 5A Medium wurde das Zellpellet in 0,5 ml Medium resuspendiert. 40 µl dieser Zellsuspension wurden dann mit 1600 U/min für 1 Min auf runde Deckgläschen (Ø 6mm, Dicke 0,17 mm) aufzentrifugiert.

2.2.2 Fura - 2 Meßtechnik

2.2.2.1 Eigenschaften des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2

Der Farbstoff wurde erstmals 1982 beschrieben (Tsien et al., 1982). Es handelt sich um eine mit Kationen Chelatkomplexe bildende Verbindung, die fluoreszierende Seitenketten trägt und je nach Bindungszustand im komplexbildenden Bereich ihre fluoreszierenden Eigenschaften verändert.

Vorteile von Fura-2 sind seine gute Calciumselektivität mit schnellen Bindungs- und Dissoziationseigenschaften sowie seine geringe pH-Empfindlichkeit im Farbstoff-Calcium-Komplex. Gute Meßbarkeit ist durch das deutliche Fluoreszenzsignal sowie eine starke Verschiebung des UV-Absorptionsspektrums nach Bindung mit Calciumionen (Ca^{2+}) gegeben. Die große Leuchtkraft von Fura-2 ergibt bei Zellbeladungen mit einer Endkonzentration des Farbstoffs zwischen 10 und 50 µM bereits deutlich über der Eigenfluoreszenz der Zellen liegende Fluoreszenzwerte. Somit ist es möglich, relativ niedrige Konzentrationen von Calcium quantitativ zu bestimmen ($\geq 5 \times 10^{-8}$ M). Die obere Grenze für meßbare Konzentrationsunterschiede liegt bei etwa 10^{-4} M, wenn alle Farbstoffbindungsstellen mit Calciumionen besetzt sind. Der Normalwert für die

Calciumkonzentration innerhalb der Zelle $[Ca^{2+}]_i$ liegt deutlich unterhalb dieses Sättigungswertes.

Fura-2 ist in zwei Formen im Handel erhältlich: als Salz und als veresterte Form (Fura-2/AM). Bei dem Salz handelt es sich um Natrium- oder Kaliumsalze des Farbstoffs, die gut wasserlöslich aber nicht membrangängig sind. Daher wird meist die veresterte Form verwendet, die als Restgruppen Acetoxymethylester gebunden hat, wodurch sie schlecht wasserlöslich, dafür aber gut membrangängig ist. Bei Inkubation von Zellen mit Fura-2/AM wird der Ester innerhalb der Zelle in einer zweistufigen Reaktion von unspezifischen, zelleigenen Esterasen abgebaut und das Molekül wird membranimpermeabel. Dies führt zeitabhängig zu einer Anreicherung des Farbstoffs in der Zelle. Nur in der deesterifizierten Form kann der Farbstoff als Indikator für die Calciumkonzentration in der Zelle verwendet werden, da er nur in dieser Form aktiv ist. Die Konzentration an aktivem Farbstoff in der Zelle kann nur schwer bestimmt werden, da die Effektivität einer Beladung stark von verschiedenen Versuchsbedingungen, wie Dauer der Inkubation und Konzentration des Farbstoffs in der Inkubationslösung, abhängt.

Als Stammlösung des bei dieser Arbeit verwendeten Fura-2/AM wurde 100 mM in DMSO angesetzt und bei $-80^{\circ}C$ gelagert. Für die Gebrauchslösung wurde diese Stammlösung mit McCoy's 5A Medium bis zu einer Endkonzentration von 4 μM verdünnt. Die auf Deckgläschen aufzentrifugierten Lymphozyten wurden in dieser Lösung 30-60 min bei $37^{\circ}C$ inkubiert.

Fura-2 ist, wie alle Fluoreszenzfarbstoffe, äußerst lichtempfindlich. Besonders bei dem hier verwendeten relativ kurzwelligen Licht tritt sehr schnell ein Ausbleichen (Photobleaching) des Farbstoffs ein. Dadurch bedingte Intensitätsschwankungen können bis zu einem gewissen Grad über die Messung mit zwei Wellenlängen (hier 340 und 380 nm) ausgeglichen werden. Starkes Ausbleichen kann jedoch dazu führen, daß die tatsächlich vorhandene Calciumkonzentration in der Zelle erheblich unterschätzt wird. Damit ein übermäßiges Ausbleichen des Farbstoffs verhindert wird, wurde die Belichtung der farbstoffbeladenen Zellen bei der hier beschriebenen Versuchsreihe mittels eines automatischen Verschlusses des Strahlengangs zwischen den Messungen auf ein Minimum reduziert. Zusätzlich wurde die Beleuchtungsstärke mittels Defokussierung des Lampenkollektors auf ein für die Restlichtbildverstärkungstechnik ausreichendes Maß herabgesenkt (Gollnick,1992).

2.2.2.2 Zwei-Wellenlängen-Messung mit Fura-2

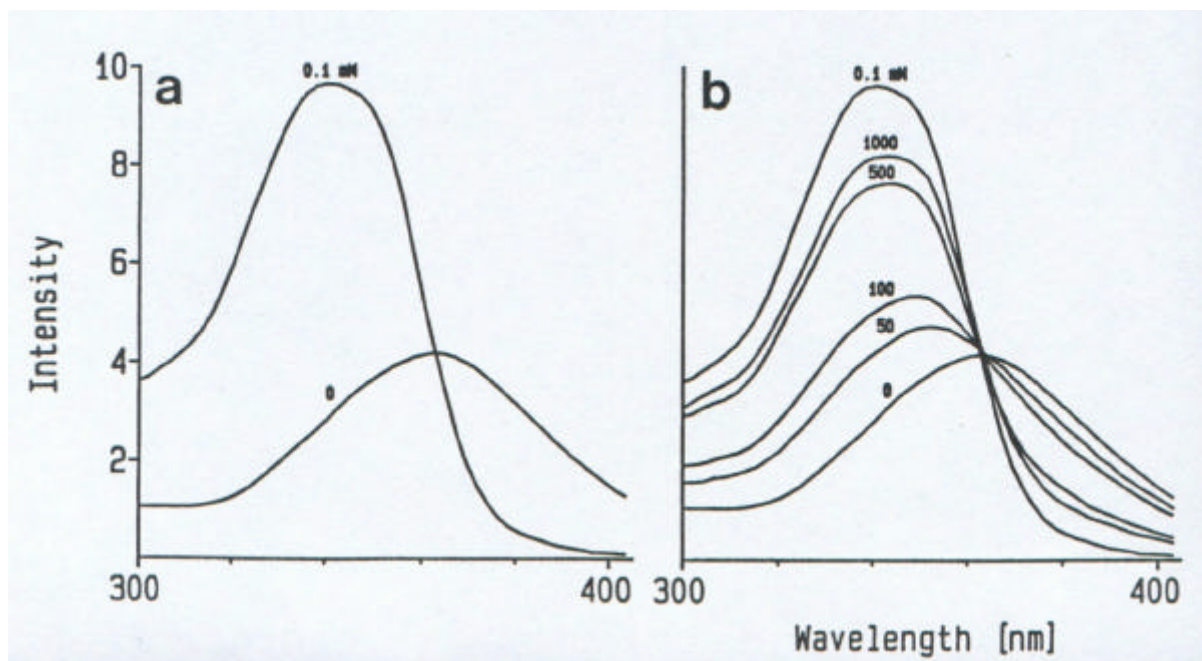
Das Anregungsdiagramm (Abb. 2) zeigt, wie Fura-2 auf eine Änderung der Calciumkonzentration mit einer Verschiebung der Anregungsintensität reagiert.

Die untere Kurve in der linken Graphik zeigt das Verhalten des Indikators bei Abwesenheit von Ca^{2+} , die obere das Verhalten bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 10^{-4} M.

Folgendes ist erkennbar:

- 1) Die emittierte Fluoreszenzintensität nimmt bei einer Anregung von 340 nm mit zunehmender Ca^{2+} -Konzentration zu.
- 2) Diese Intensität nimmt aber bei 380 nm und wiederum zunehmender Ca^{2+} -Konzentration ab.
- 3) Das Absorptionsmaximum des Farbstoffs verschiebt sich während der Sättigung mit Ca^{2+} von 362 nm auf 335 nm (Spektralshift).

Abb. 2: Anregungsdiagramme von Fura-2 bei a) 0 und 0,1 mM und b) bei verschiedenen Konzentrationen von Ca^{2+} . (nach Gollnick, 1992; verändert nach Grynkiewicz et al., 1985)



Aus der rechten Graphik ist ersichtlich, daß bei etwa 360 nm ein Bereich liegt, bei dem die Fluoreszenz unabhängig von der Ca^{2+} -Konzentration ist (Isosbestischer Punkt). Steigende Ca^{2+} -Konzentrationen in der Zelle führen somit bei Anregungswellenlängen unter 360 nm zu einer Fluoreszenzzunahme, während es bei Anregungswellenlängen über 360 nm zu einer

Abnahme der Fluoreszenzintensität kommt. Dieser Umstand ermöglicht eine relative Bestimmung der Calciumkonzentration in der Zelle, indem man die Fluoreszenzhelligkeit bei 340 und 380 nm Anregungslicht durcheinander dividiert. Dabei kürzen sich Fehler, die durch Schwankungen der Indikatorkonzentration entstehen aus, allerdings nur innerhalb relativ enger Grenzen (Gollnick, 1992).

2.2.3 Versuchsaufbau

2.2.3.1 Verwendete Geräte

Die hier beschriebenen Versuche wurden am Physiologischen Institut II der Universität Bonn durchgeführt. Der Versuchsaufbau bestand aus einem Mikrospektrofluorimeter mit einem Lichtmikroskop (Zeiss IM 35), das mit Epifluoreszenz-, Hellfeld- und Phasenkontrasteinrichtung ausgerüstet war. An das Mikroskop waren zur Aufnahme der Meßwerte eine Video-Restlichtverstärkungskamera und ein Photomultiplier angeschlossen. Alle im anregenden Strahlengang zwischen Fluoreszenzanregungslampe und Untersuchungsobjekt liegenden optischen Elemente bestanden aus Quarzglas, womit die Transmission bei 340 nm Anregungswellenlänge verbessert wurde (Gollnick, 1992).

Für die Fluoreszenzbeleuchtung wurde das Mikroskop mit einem Leitz Lampenhaus 250 mit Osram XBO 150 W/1 Lampe und einem Quarzkollektor ausgestattet. Die Durchlichtbeleuchtung war mit einem Rotlichtfilter ausgestattet, so daß ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs während des Einlegens der zellbeschichteten Deckgläschen reduziert wurde. Ein speziell angefertigtes Übergangsgehäuse zwischen Lampenhaus und Mikroskop diente zur Aufnahme des computergesteuerten Lampenverschlusses sowie des drehbaren, ebenfalls computergesteuerten Filtrerrades für den Fura-2 Anregungsfilter. Mit einem Steuerungscomputer wurde der Betrieb von Verschluss und Filtrerrad über ein digitales Bildanalysesystem mit der Bilderfassung synchronisiert. Die beiden Schrittmotoren wurden über einen eigens dafür konstruierten und programmierten PC gesteuert (Gollnick, 1992).

Der Anregungsfiltersatz bestand aus zwei Bandpaß-Erregerfiltern der Firma Zeiss mit Solltransmissionen von 340 und 380 nm. Im Mikroskopstrahlengang selbst wurde ein Zeiss Farbteiler FT 395 sowie, als Emissions-Langpaßfilter, die Filterkombination Zeiss LP 420 + Schott BG (4 mm stark) gewählt, dies führte zu einer erhöhten Lichtausbeute (Gollnick, 1992). Der Strahlengang des emittierten Lichtes wurde auf einen Photomultiplier (Zeiss, Hamamatsu), auf das Binokular sowie die Restlichtverstärkungskamera aufgeteilt. Das

Bildverarbeitungssystem bestand aus einer Restlichtverstärkungs-Videokamera (Hamamatsu), einem Kontrollmonitor (Sony) sowie dem Hamamatsu ICMS (siehe 2.3.3.).

2.2.3.2 Versuchskammer

Als Zubehör zu dem Zeiss-Mikroskop wurde ein Objektisch gebaut, der aus einer runden, nach oben offenen Plexiglaskammer (Volumen etwa 0,4 ml) bestand, deren Boden ein 0,16 mm starkes Quarzglasscheibchen bildete. Die Kammer enthielt Zu- und Abläufe für frisches Kulturmedium oder Mitogenlösungen die mit Hilfe einer Pumpe transportiert wurden. Die Kammer war temperierbar mittels eines ringförmigen Wasserdurchlaufs um das Kammerlumen herum, der über ein Wasserbad beheizt wurde. Zur Temperaturkontrolle war in das Kammerlumen ein elektronischer Temperaturfühler eingelassen.

Ein EMF bis zu 1,3 mT konnte mittels eines Generators und um die Kammer gewickelter Kupferdrähte erzeugt werden. Höhere Feldstärken konnten nicht verwendet werden; die hierbei entstehende starke Erwärmung der Drähte führte zu Verzerrungen der Plexiglaskammer.

Eine kleine Feder diente zum Festhalten der zellbeschichteten Deckgläschen am Kammerboden. Die Auswertung erfolgte mit einem Ultra-Fluar 100 Objektiv mit Glycerinimmersion.

2.2.3.3 Intracellular Ca^{2+} Measurement System (ICMS)

Das ICMS wurde von der Firma Hamamatsu speziell für die Ionenlokalisierung mit Zwei-Wellenlängen-Fluoreszenzfarbstoffen entworfen. Es besteht aus einem Hamamatsu-Echtzeitbildprozessor DVS 3000, einem Compaq Deskpro 386/20e PC mit Datenmonitor und 110 MByte Festplattenlaufwerk sowie einem Farbbildmonitor. Die von der Kamera gelieferten Bilder werden im DVS 3000 online digitalisiert und an einem PC weiterverarbeitet. Der PC steuert die erforderlichen Funktionen und gibt auch das Signal für den PC, der Filterrad und Lichtverschluß steuert. Die verwendete Software wurde in Zusammenarbeit von Hamamatsu Photonic und dem Physiologischen Institut der Universität Bonn aus einer Basissoftware weiterentwickelt (Gollnick, 1992).

Vor Beginn einer Aufnahmeserie wurde die notwendige Lichtverstärkung für die Kamera ermittelt und danach nicht mehr verändert. Dann wurden ein Dunkelstrombild für die spätere Dunkelstromkorrektur sowie ein Hellfeldbild abgespeichert. Während der anschließend

gestarteten Bildeinzugsserie wurden die digitalisierten Bilder online gemittelt und durch Subtraktion des Dunkelstrombildes korrigiert bevor sie gespeichert wurden.

2.2.3.4 Auswertung der ICMS-Bilder am PC

Die digitalisierten Fluoreszenzbilder wurden mit dem, vom Physiologischen Institut Bonn entwickelten, Computerprogramm "grau0206" weiterbearbeitet. Nach Festlegung eines geeigneten Schwellenwertes, der die Zellen stärker vom Hintergrund abhebt, wurde ein erstes Ratio-Bild erstellt. Dieses entsteht nach Division der zwei unmittelbar hintereinander aufgenommenen Bilder eines Meßpunktes bei 340 und 380 nm (Ratio 340/380 nm). An dieser Stelle bestand nochmals die Möglichkeit, die Grenzen der Farbskala in einem Histogramm an den jeweiligen Versuch anzupassen. Die nun berechnete Ratio-Bildreihe wurde in Falschfarben dargestellt, wobei Blau eine relativ niedrige Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle charakterisierte, die sich über Grün (mittlere $[\text{Ca}^{2+}]_i$) zu Rot (relativ hohe $[\text{Ca}^{2+}]_i$) steigern konnte. Die errechneten Ratio-Werte als relatives Maß für die Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle konnten in einem zweiten Bearbeitungsschritt für einzelne, ausgewählte Zellen als Kurven dargestellt werden.

2.2.4 Versuchsdurchführung

Die Versuchsreihen bestanden aus 150 Bildern, die im Abstand von 10 sec aufgenommen wurden. Während der ersten 500 sec erfolgte keine Behandlung, um die Spontanrate bei der Calciumaufnahme in dieser Zellpopulation zu erfassen. Zeigte sich hier schon eine erhöhte Aktivität, wurde der Versuch verworfen. Während der zweiten 500 sec wurde, nach Umlegen eines Dreiwegehahns, die Zufuhr von Medium durch eine PHA-Medium-Lösung ersetzt. Dabei wurden die Zellen aktiviert und somit ein erhöhter Calciumspiegel provoziert. Für die letzten 500 sec wurde ein EMF von 1,3 mT zugeschaltet. Folgende Kontrollen wurden durchgeführt:

- Nullkontrollen (1500 sec ohne jede Behandlung, damit die Rate an verspäteten Spontanreaktionen abgeschätzt werden kann) und
- PHA-Kontrollen (Mitogenzugabe ab 500 sec bis 1500 sec ohne zugeschaltetes Feld, damit die Rate von verspäteten Reaktionen auf die PHA-Behandlung abgeschätzt werden kann).

2.3 Versuche zum Einfluß von EMF auf den Calciumhaushalt von Zellpopulationen

Die im Folgenden beschriebenen Experimente wurden in den "Bioelectromagnetic Laboratories" von Dr. Jan Walleczek in Stanford, USA, durchgeführt.

2.3.1 Zellpräparation

Diese Versuche wurden ebenfalls mit isolierten Lymphozyten durchgeführt. Weil für die Versuche eine hohe Anzahl an Zellen benötigt wurden, erfolgte die Trennung der Lymphozyten aus dem Buffy Coat eines Spenders (Blood Bank, Stanford School of Medicine). Isoliert wurde mit Ficoll Histopaque-1077 (Sigma). Die isolierten Lymphozyten wurden in Hank's-Lösung gewaschen, gezählt und dann auf eine Anzahl von 10×10^6 Zellen pro ml verdünnt. 3 μM des Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2/AM wurden der Suspension zugefügt und die Zellen für 70 bis 90 min bei 37°C mit dem Farbstoff beladen. Danach wurden die Lymphozyten in Calcium-Puffer gewaschen und erneut auf eine Dichte von 10×10^6 Zellen/ml eingestellt. Von dieser Suspension wurden in jede der beiden Küvetten pro Versuch 3 ml eingefüllt.

Weil Calciumionen in jedem Kulturmedium vorhanden sein müssen und somit nicht separat meßbar sind, wurde die Konzentration von Manganionen (Mn^{2+}) gemessen. Wenn Mn^{2+} an ein Fura-2 Molekül bindet, wird dessen Lichtemission gesenkt (gequencht). Extern zugegebenes Mn^{2+} hat die gleichen Transportwege durch die Membran wie Ca^{2+} und somit kann die Rate der Fluoreszenzabnahme durch Mn^{2+} als Maß für die Ca^{2+} -Influxrate gewertet werden (Merrit et al., 1989).

2.3.2 Versuche mit dem DRFS - Differential Ratiometric Fluorescence Spectroscopy

2.3.2.1 Simultanmessung (Real-Time-Exposure) mit dem Spectrofluorimeter

Dieser Apparat wurde so konstruiert, daß Veränderungen in 2 Küvetten gleichzeitig erfaßt und aufgezeichnet werden können. Die beiden Kammern für Exposition und Kontrolle waren dabei in einem Abstand von 1 m voneinander installiert, damit magnetische Streufelder, die von der Magnetspule in der Expositions-kammer erzeugt werden, bei den Kontrollen ausgeschlossen werden konnten (Abb. 3 und Abb. 4).

Licht zweier Wellenlängen (340 ± 5 und 380 ± 5 nm) wird mit einem schnellen Wechsel zweier Bandpaß-Erregungsfilter vor einer 75 W Xenon-Bogenlampe (Mod. D103, Photoscan. Photon Technology International, Inc.) erzeugt. Der Strahlengang des emittierten Lichtes wird auf 2 Leitungen eines gegabelten Quarzfaserkabels aufgeteilt und so das Licht der beiden Wellenlängen am gemeinsamen Ende der Leitungen abwechselnd präsentiert um Helligkeitsunterschiede in den Proben zu detektieren. Damit garantiert ist, daß die beiden Proben in den Küvetten die gleiche "Menge" an "gechopptem" (zerhacktem) 340/380 nm Licht erhalten, wird das Licht aus dem ersten Faserkabel durch ein zweites gegabeltes Glasfaserkabel geschickt ("optical coupling"). Die beiden Enden dieses zweiten Kabels sind jeweils an eine Kammer angeschlossen. Diese besteht aus schwarzen, 1,25 cm dicken Acrylplatten und läßt somit kein Raumlicht eindringen. Die Abmessungen der Acrylboxen sind mit 0,38 x 0,38 x 0,32 m so groß, daß sie ein Wasserbad für die Küvette und eine wassergekühlte Magnetspule aufnehmen können. Damit mögliche Störungen durch experimentell bedingt auftretende Magnetfelder vermieden werden, wurde eine Küvettenhalterung aus metallfreiem Material entworfen. Eine metallene Küvettenhalterung könnte mittels Interaktionen eine Verzerrung des applizierten Magnetfeldes hervorrufen.

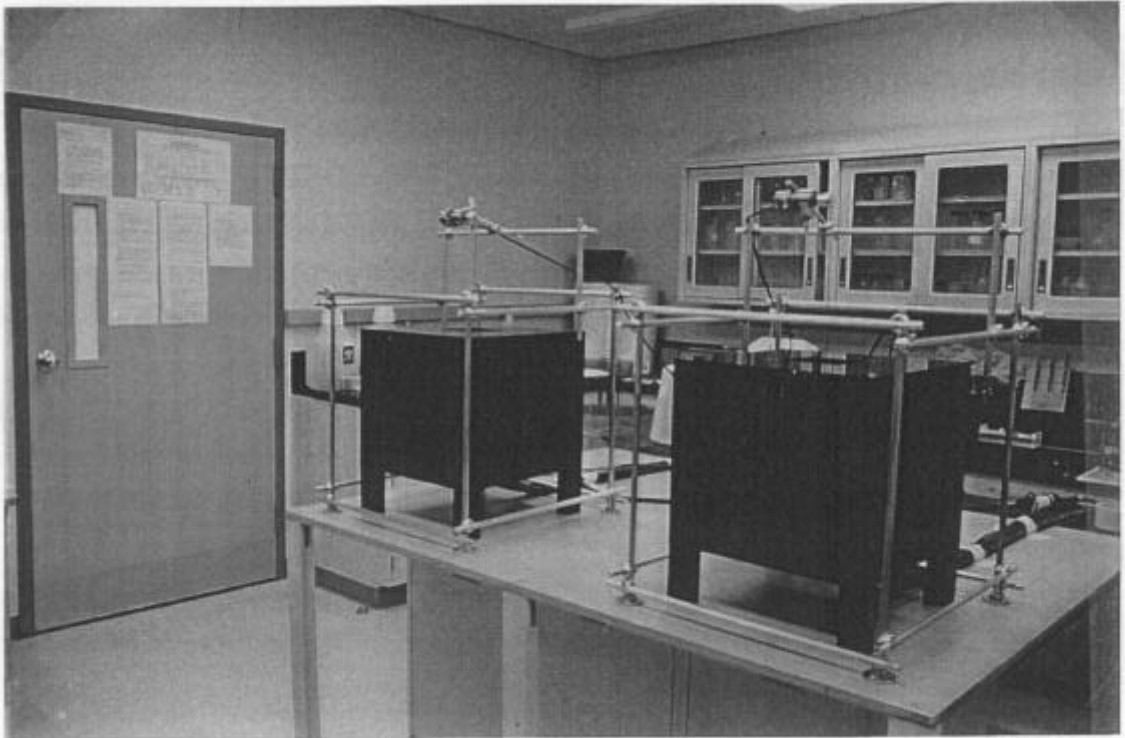
Die Stelle in der Küvette, welche von den beiden getrennten Anregungslichtstrahlen bestrahlt wird, kann individuell mit einer Höhenregelung und mit Hilfe einer Mikrometerschraube für Spalthöhe und -weite eingestellt werden. Dies ist wichtig für die Lichtregelung in den beiden Küvetten während der Kalibrierung der Anlage.

Nachdem ein 340/380 nm Anregungslichtstrahl in die Kammer eingedrungen ist, wird er von einer Silikat-Linse (\varnothing 38 mm) zu der Küvette gelenkt. Emissionslicht, welches die Küvette verläßt, wird von einer zweiten Quarz-Linse über ein Interferenzbandfilter (150 ± 10 nm) an einen Photomultiplier (Mod. 610, Photon Technology International, Inc.) weitergegeben, der

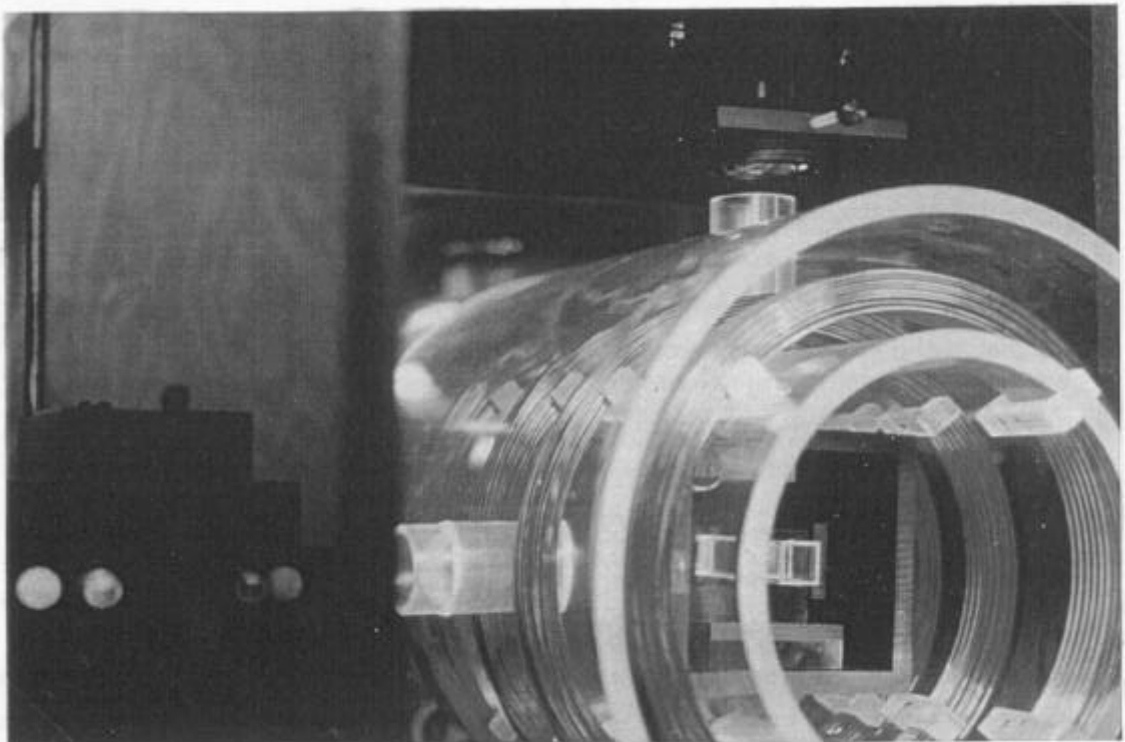
die eingehenden Lichtsignale zählt. Die aus den Lichtsignalen in elektrische Signale umgewandelten Informationen der beiden Photomultiplier werden anschließend mit einem Computerprogramm miteinander verrechnet. Während des Versuchs wird die simultane Berechnung der beiden gleichzeitig gemessenen Fluoreszenzsignale von Exposition und Kontrolle (Real-Time Exposure) auf dem Bildschirm als Kurvenbild sichtbar gemacht.

Abb. 3: DRFS-System: Es wurden zwei identische Kammern mit je einem Küvettenhalter in der Exposition- und der Kontrollkammer gebaut. Helmholtzspulen wurden so installiert, daß thermische Effekte ausgeschlossen werden konnten (die Fotos wurden von Dr. Walleczek zur Verfügung gestellt).

(a) Gesamtansicht der Anlage mit Expositions- und Kontrollkammer



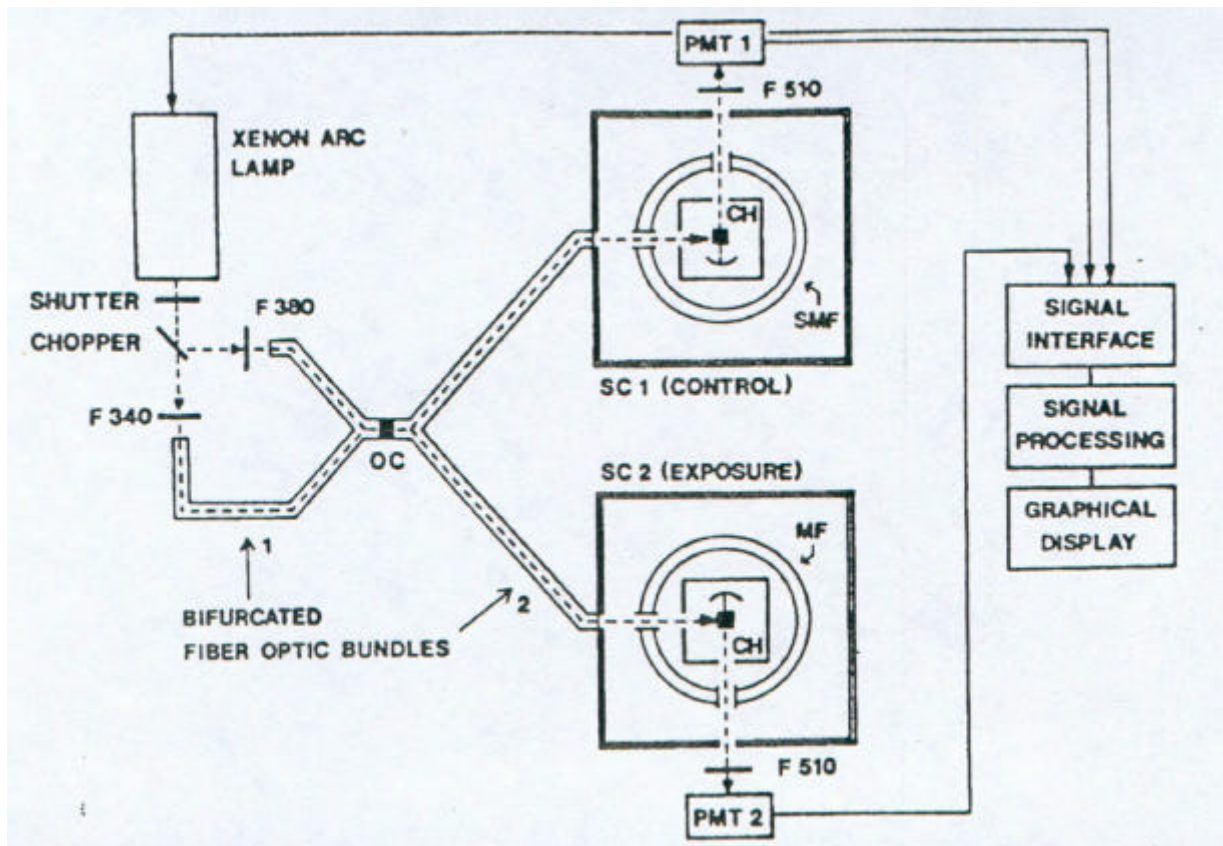
(b) Blick in die Expositions-kammer



2.3.2.2 Nichtmetallischer, thermoregulierter Küvettenständer

Ein Küvettenständer ohne metallische Bestandteile war entworfen worden, damit Verzerrungen im sorgfältig applizierten und kontrollierten elektromagnetischen Feld im Bereich der Proben vermieden werden, wie sie mittels elektrischer Ströme in Metallteilen hervorgerufen werden können. Die hier verwendeten Küvettenhalter und Wasserbäder sind ebenfalls, wie die Kammern, aus Acryl (Abmessungen: 76 x 76 x 65 mm).

Abb. 4: DRFS-Anlage für Magnetfeldstudien mit dem fluoreszierenden Farbstoff Fura-2/AM. Erklärung der Abkürzungen: CH, nichtmetallischer thermoregulierter Küvettenständer; F, Interferenzfilter (340 oder 380 nm Bandpaßfilter); MF, wassergekühlte Magnetspule; OC, "Optical coupling"; PMT, Photomultiplier; SC, Acrylkammer. Durchgezogene Linien deuten elektronische Kabelverbindungen an, gestrichelte Linien Strahlengänge von Anregungs- und Emissionslicht (Walleczek, 1994).



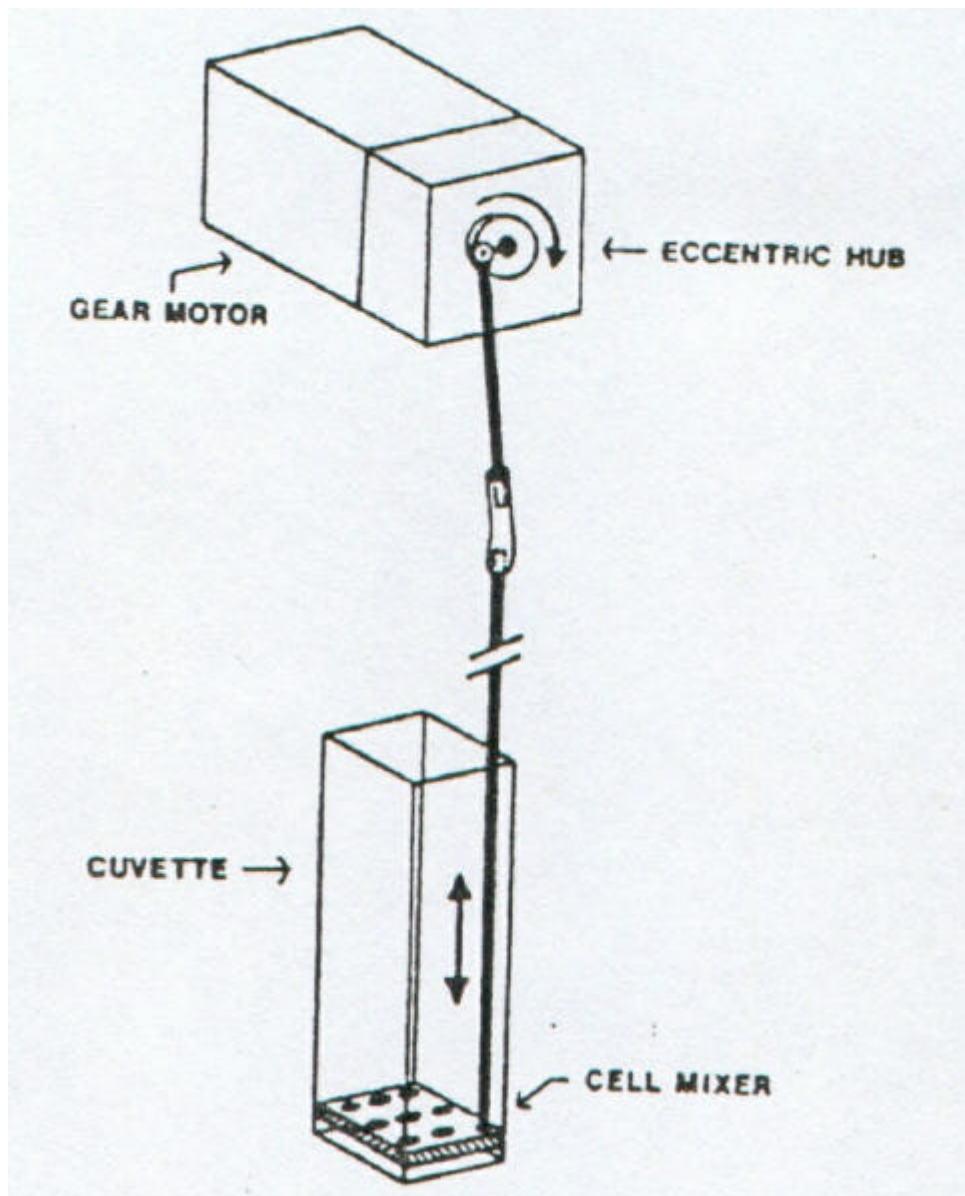
Anregungslicht dringt durch einen Saphirspalt (\varnothing 20 mm, Melles-Griot), der zur Vermeidung von Reflektionen mit Magnesiumfluorid (MgF) beschichtet ist. Wenn der Lichtstrahl die Küvette passiert hat, wird er, zur höheren Lichtausbeute, nochmals durch einen flachen Aluminium-Spiegel (\varnothing 12,5 mm, Melles-Griot) in die Küvette zurückgeschickt. Das daraus resultierende Emissionslicht wird von einer, wiederum mit MgF beschichteten, Plano-Convex-Saphirlinse (\varnothing 20 mm, Melles-Griot) zum Photomultiplier weitergeleitet. Zusätzlich wird Streulicht, das nicht direkt zum Photomultiplier geschickt wurde, mit einem konkaven Aluminiumreflektor (\varnothing 30 mm, Melles-Griot) gesammelt und in Richtung Saphirlinse geschickt. Diese Zusammenstellung der optischen Geräte im Wasserbad soll den Lichtverlust kompensieren, der sowohl von den anderen vorhandenen Geräten hervorgerufen wird, als auch von dem deionisierten Wasser im Küvettenhalter. Außerdem wird die Ausbeute an Emissionslicht gegenüber einem konventionellen Metall-Küvettenhalter 1,6-fach erhöht.

Ein weiterer Vorteil des Küvettenhalters besteht darin, daß er den direkten Kontakt der Küvette und der darin enthaltenen Probe mit dem sie umgebenden temperierten Wasser erlaubt. Dies ermöglicht einen schnellen Wärmeaustausch zwischen Küvetteninhalt und Wasserbad und somit eine genauere Temperaturkontrolle in der Probe. Die Temperatur wird mit zirkulierendem Wasser von einem extern liegenden Wasserbad aus gesteuert. Das Wasser fließt dabei von unten in den Küvettenhalter ein und wird nahe der Wasseroberfläche über einen kleinen Auslauf abgepumpt. Die beiden Kammern werden von zwei identischen Wasserbädern beheizt.

2.3.2.3 Nichtmagnetischer Rührer

Damit sich die Zellen während des Versuchs nicht am Boden absetzen, war der Einbau eines Suspensionsmixers notwendig. Weil konventionelle Magnetrührer nicht verwendbar sind, wird ein System zum Mischen der Zellkulturen verwendet, das extern betrieben wird (Abb. 5). Ein sich langsam drehender Motor bewegt einen Hub, der die Drehbewegung in eine auf-und-ab Bewegung des Zellmixers in der Küvette umwandelt. Die sich ständig wiederholende Bewegung hebt mit etwa 3 Hz eine flache perforierte Plastikscheibe von 9 x 9 mm am Ende eines Plastikstabes um 3 mm an und garantiert so eine ständig in Bewegung bleibende Zellsuspension. In beiden Kammern werden identische Rührer verwendet. Die vom Motor erzeugten Streufelder lagen nach einer Messung mit einem Fluxdensitometer (Fa. Bartington, Mod. MAG-03 MC) mit $\leq 0,5 \mu\text{T}$ unter der Raumbelastung.

Abb. 5: Nichtmagnetischer Rührer (Walleczek, 1994).



2.3.2.4 Befeldung

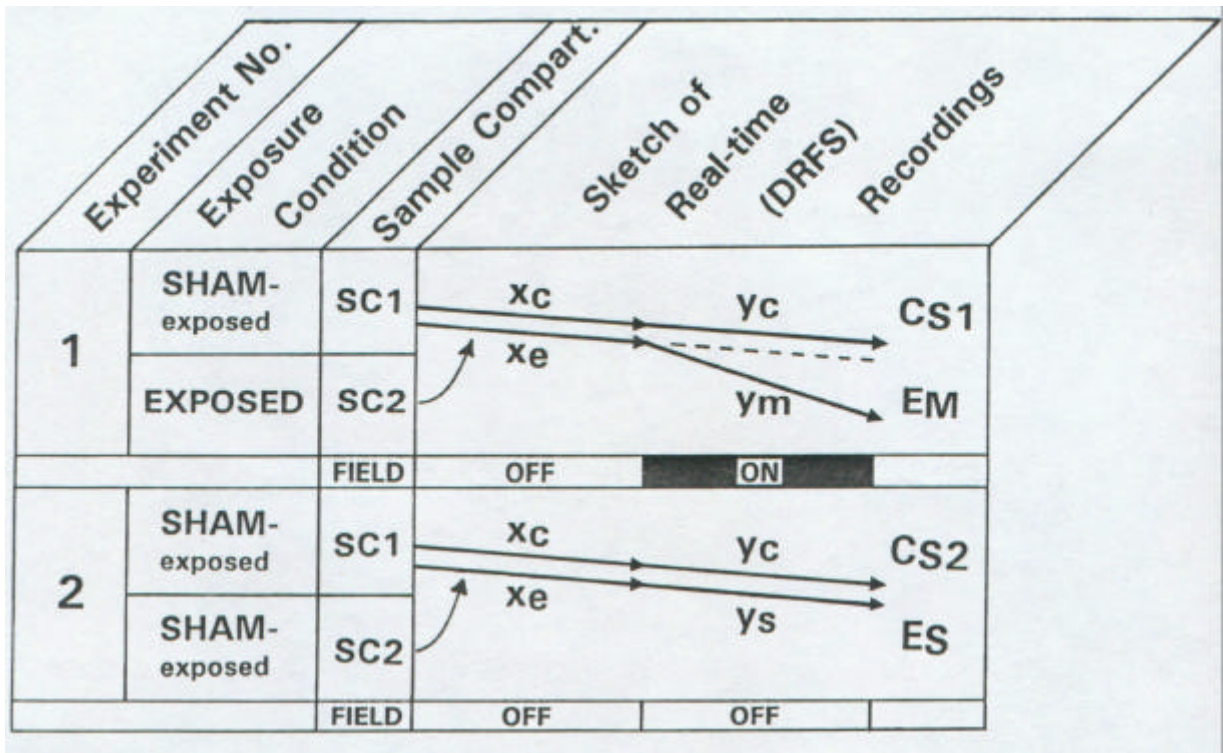
Zur Befeldung diente eine wassergekühlte Magnetspule (Lee Whiting 4-Coils), die mit Kupferdraht umwickelt ist. Bei einem Wechselfeld von 50 Hz entspricht eine magnetische Flußdichte von 1 mT einem Stromfluß von 727 mA. Die gemessene Flußdichte der Streufelder ist im Bereich der Kontrollkammer vernachlässigbar.

2.3.2.5 Quantifizierung der Magnetfeldeinflüsse

Für die Quantifizierung der Magnetfeldeinflüsse auf die simultan (Real-Time) untersuchten Zellpopulationen wurden strenge Meßkriterien entwickelt. Jeder hier beschriebene experimentelle Datensatz wird aus zwei voneinander unabhängigen Versuchsaufzeichnungen berechnet. Ein solches Set beinhaltet die Daten von zwei simultan gemessenen Zellproben in der Kontrollkammer (SC1) und in der Expositions-kammer (SC2). Da jedoch in der Expositions-kammer während des ersten Laufs kein Magnetfeld eingeschaltet wird (Sham/Sham-Experiment), müssen hierbei gefundene Differenzen zwischen SC1 und SC2 auf Meßfehlern beruhen. Das folgende Experiment wird anschließend nach dem gleichen Protokoll durchgeführt, zusätzlich wird jedoch ein Feld zugeschaltet (Sham/Exposure-Experiment). Dieses doppelt geführte Protokoll (Abb. 6) stellt sicher, daß sowohl die nichtbiologisch bedingten Varianzen herausgefiltert werden, als auch biologische wie etwa zeitabhängige Veränderungen der Zellantwort. Mehrmalige Durchführung dieses doppelten Versuchsansatzes in einer Versuchsserie macht die Ermittlung von Magnetfeldeffekten noch genauer.

Die statistische Auswertung erfolgte mit einem Vergleich der Varianzen in Sham/Sham und in Sham/Exposure-Experimenten. Hierfür wurde der "Student t-Test" verwendet.

Abb. 6: Experimentdurchführung: Die Beschriftungen x_c , y_c , x_e , y_m und y_s beschreiben Ca^{2+} oder Mn^{2+} -Influxraten, die mit einer Regressionsanalyse für einzelne simultane (Real-Time) Fura-2/AM Fluoreszenzaufzeichnungen berechnet werden. Hierbei stehen x_c , x_e für die jeweilige Influxrate in SC1 oder SC2 vor der Befeldung und y_c , y_m , y_s für die Influxraten während der Befeldung. Der Effekt des Magnetfeldes auf die Ca^{2+} oder Mn^{2+} Influxrate wird prozentual beschrieben als $[(x_e - y_m)/x_e] - [(x_c - y_c)/x_c] \times 100$. Die prozentuale Differenz in den Ca^{2+} oder Mn^{2+} -Influxraten zwischen einzelnen Lymphozytenpräparationen in der Kontrollkammer SC1 und der Expositions-kammer SC2 ist dabei nicht von einem Magnetfeld bedingt und wird beschrieben als $[(x_e - y_s)/x_e] - [(x_c - y_c)/x_c] \times 100$. Die Beschriftungen C_{S1} , E_M , E_S und C_{S2} beschreiben einzelne Versuchsaufzeichnungen. Sham/Exposure- (No.1) und Sham/Sham-Experimente (No.2) wurden abwechselnd durchgeführt (Walleczek, 1995).



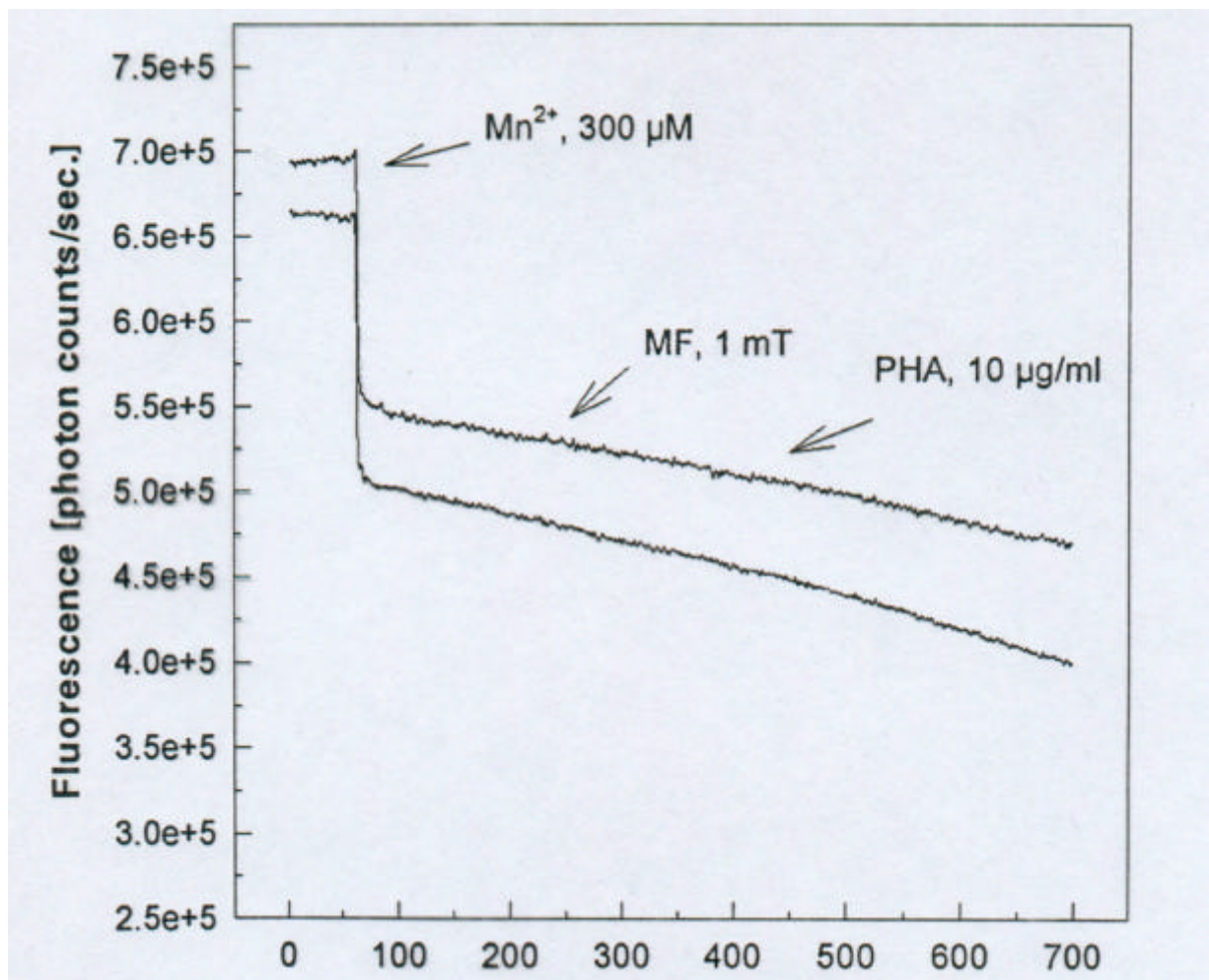
2.3.3 Experimente zum Einfluß von Magnetfeldern

Jedes einzelne Experiment besteht aus einem Satz von 700 Datenpunkten, die in Intervallen von 4 sec aufgenommen wurden. In den ersten 60 sec wurde der Basiseinstrom von Calciumionen in die getesteten Zellen in der Suspension beobachtet. Zum Zeitpunkt $t = 60$ sec, wurden den beiden Kulturen gleichzeitig $300 \mu\text{M Mn}^{2+}$ zugegeben. Manganionen gelangen über die gleichen Membrantransportwege in die Zelle wie Calciumionen, sie sind daher ein gut meßbarer Ersatz für das stets anwesende Calcium. Zum Zeitpunkt $t = 200$ sec wurde in der Expositions-kammer während der Sham/Exposure-Experimente ein Magnetfeld von 1 mT zugeschaltet. Zum Zeitpunkt $t = 380$ sec wurde nun wieder gleichzeitig in beide Küvetten

10 µg/ml PHA zugegeben. Das Quenching der Fluoreszenzfarbe infolge der verschiedenen Behandlungen konnte am Computerbildschirm verfolgt werden (Abb. 7).

Insgesamt wurden 104 Experimente durchgeführt, 53 davon Sham/Exposure-Experimente und 51 Sham/Sham-Experimente.

Abb. 7: Calcium-Influx (gemessen als Mn^{2+} -Influx) in menschliche Lymphozyten. Gezählt werden die Photonemissions-Signale/sec über einen Versuchszeitraum von 700 sec: Mit Pfeilen sind die Zeitpunkte der Zugaben von Mn^{2+} und PHA bzw. das Einschalten des Magnetfeldes (1 mT) angezeigt. Kurve A beschreibt den Versuchsverlauf für die exponierten Zellen. Kurve B den für die Kontrollen.



2.3.4 Experimente mit dem Calcium-Antagonisten Nifedipin

Für diese Versuchsserie werden die Zellen wie oben beschrieben isoliert und behandelt. Unmittelbar vor Beginn eines Experiments wird den benötigten 6 ml Zellsuspension 50 μ M Nifedipin zugegeben bevor die Zellen in die beiden Küvetten verteilt werden.

Es wurden je 24 Experimente für Sham/Sham und Sham/Exposure durchgeführt. Kontrollversuche ohne Zugabe von Nifedipin wurden 5 mal wiederholt.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluß elektromagnetischer Felder auf das Teilungsverhalten von Lymphozyten

3.1.1 Einfluß auf das Wachstum von Lymphozyten in Vollblutkulturen

Die Kultivierung von menschlichen Lymphozyten in Vollblutkulturen in Gegenwart eines magnetischen Feldes der Stärke 5 mT bei 50 Hz führte zu einer deutlichen Beeinflussung des Zellzyklus. Die Anzahl der Zellen in der zweiten Mitose (M2) lag bei den befeldeten Kulturen höher und somit senkte sich prozentual entsprechend die Anzahl der Zellen in der ersten Mitose (M1). Diese Effekte waren signifikant (Abb. 8 und Abb. 14) (Antonopoulos et al., 1995). Mit Ausnahme der experimentellen Reihe 24+, in der die Zellen nur für die ersten 24 Std. einem Feld von 5 mT ausgesetzt waren, ergaben sich keine signifikanten Abweichungen der Zellzyklusgeschwindigkeit gegenüber den Kontrollkulturen. Bei den 24+-Versuchen lag jedoch die Anzahl der M1 in den befeldeten Zellen signifikant unter der der M1 in den Kontrollkulturen. Die Prozentsätze von M2 und M3+ Zellen unterschieden sich in den befeldeten Zellkulturen nicht von denen in den Kontrollen (Abb. 9 und Abb. 14). Dasselbe Ergebnis ergab sich für eine Exposition der Lymphozyten nach den ersten 24 Std. in Kultur (24-). Auch hier ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen exponierten und Kontrollkulturen finden (Abb. 10 und Abb. 14).

In Versuchsreihen, bei denen mit niedrigeren magnetischen Flußdichten gearbeitet wurde konnten teilweise ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen befeldeten und Kontrollkulturen gefunden werden. Bei 0,5 mT war dies sowohl für M1 als auch für M2 der Fall (Abb. 11 und Abb. 15), bei 1 mT nur bei M2 (Abb. 12 und Abb. 15). Bei 2 mT konnte keine Veränderung des Zellzyklus gefunden werden (Abb. 13 und Abb. 15).

Der Proliferationsindex (PI) war in den exponierten HPL leicht, aber nicht signifikant, erhöht. Für jeden Versuchspunkt wurden in fünf verschiedenen Blutproben mindestens 100 Mitosen ausgewertet.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Experimente einen statistisch signifikanten Einfluß von EMF bei den Frequenzen 0,5, 1 und 5 mT zeigen. Die Zellzyklusbeschleunigungen bei

diesen Frequenzen zeigen einen Anstieg von mindestens 5%. Die Daten für die Versuche mit 2 mT zeigen dagegen keinerlei Effekt (Tabelle 1).

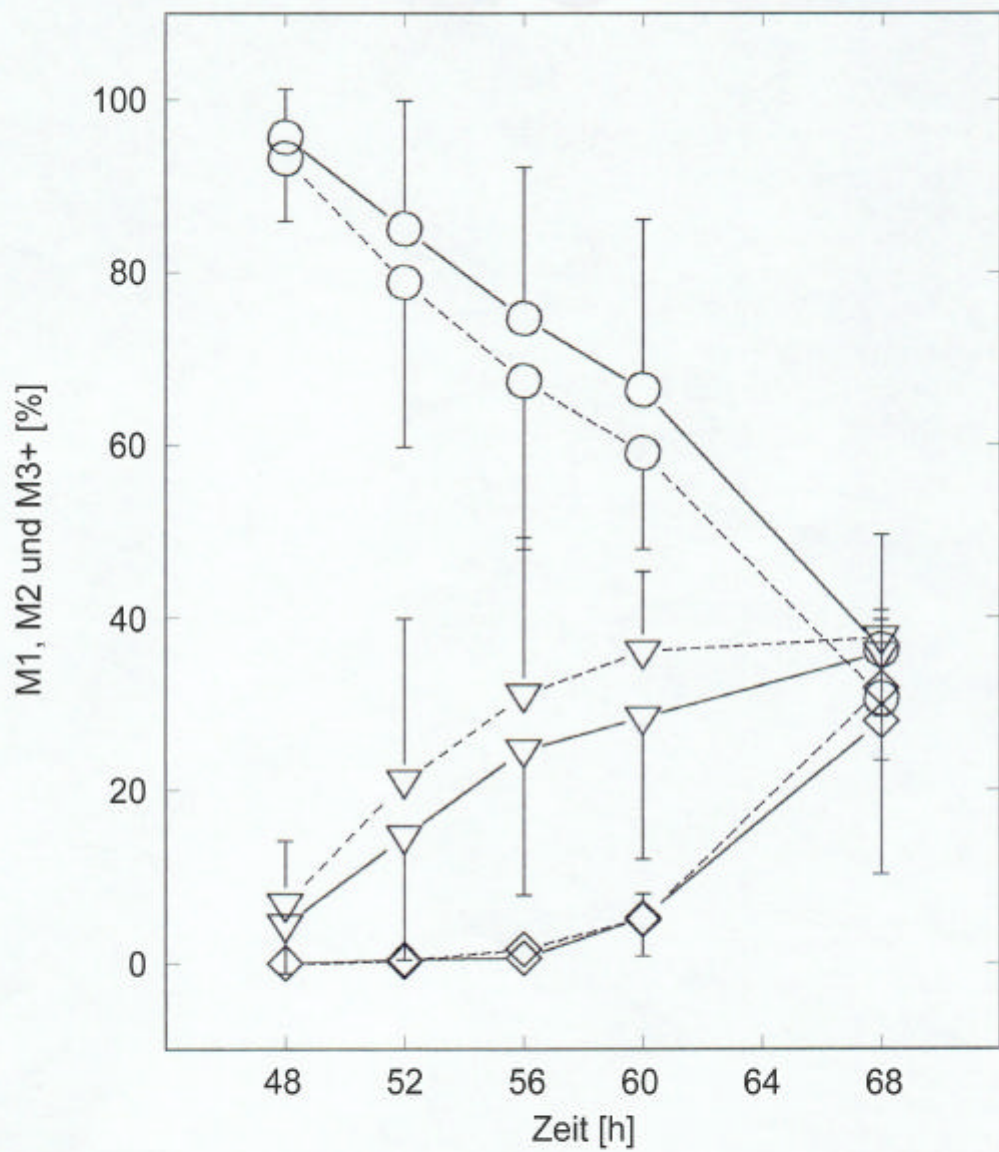
Tabelle 1: Einflüsse elektromagnetischer Felder verschiedener Flußdichte auf die Differenzen (Δ) von M1-, M2- und M3+ Zellen.

Exposition	0,5 mT	1 mT	2 mT	5 mT	5 mT 24 h +	5 mT 24 h -
M1	s	ns	ns	s	s	ns
M2	s	s	ns	s	ns	ns
M3+	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Die statistische Analyse (siehe 2.1.8) der Unterschiede zwischen befeldeten und Kontrollkulturen (Δ_{ij}) waren signifikant "negativ" für M1 und signifikant "positiv" für M2 und M3+. Der verwendete Test (zugrundeliegende Testhypothese $H_0: \mu_{\Delta_{ij}} = 0$) wurde mit dem zeitunabhängigen Δ_{ij} durchgeführt, wobei berücksichtigt wurde, wie weit Δ_{ij} von 0 abweicht.

s = Unterschiede signifikant auf dem 1 % Niveau; ns = nicht signifikant

Abb. 8

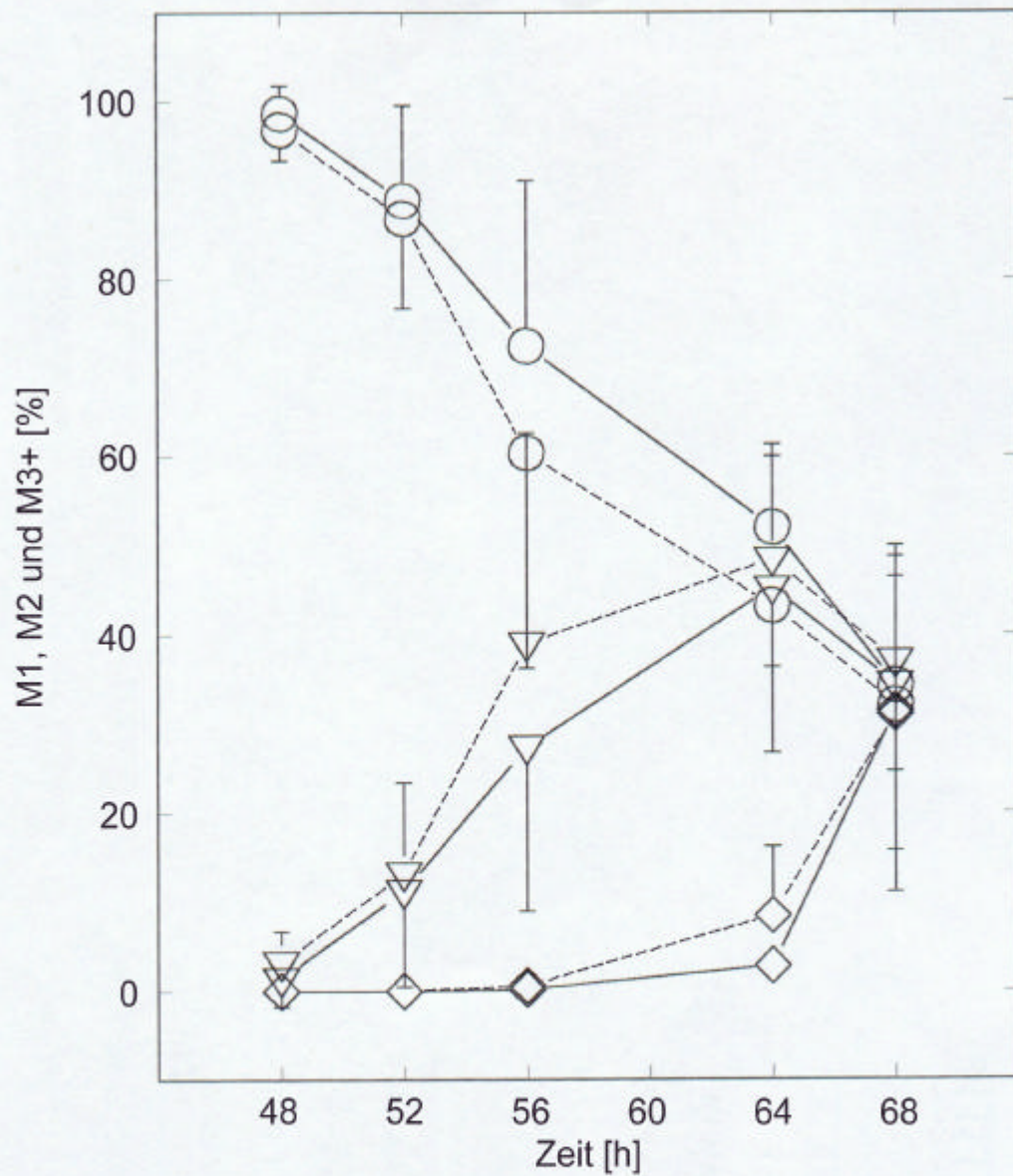


Prozentuale Anteile von M1, M2 und M3+ in HPL, kultiviert in Gegenwart oder Abwesenheit eines Feldes von 5 mT.

----- Mit Feld (Exposition) ——— ohne Feld (Kontrolle)

○ M1 ▽ M2 ◇ M3+

Abb. 9



Prozentuale Anteile von M1, M2 und M3+ in HPL, kultiviert in Gegenwart oder Abwesenheit eines Feldes von 5 mT während der ersten 24 Stunden.

----- Mit Feld (Exposition)

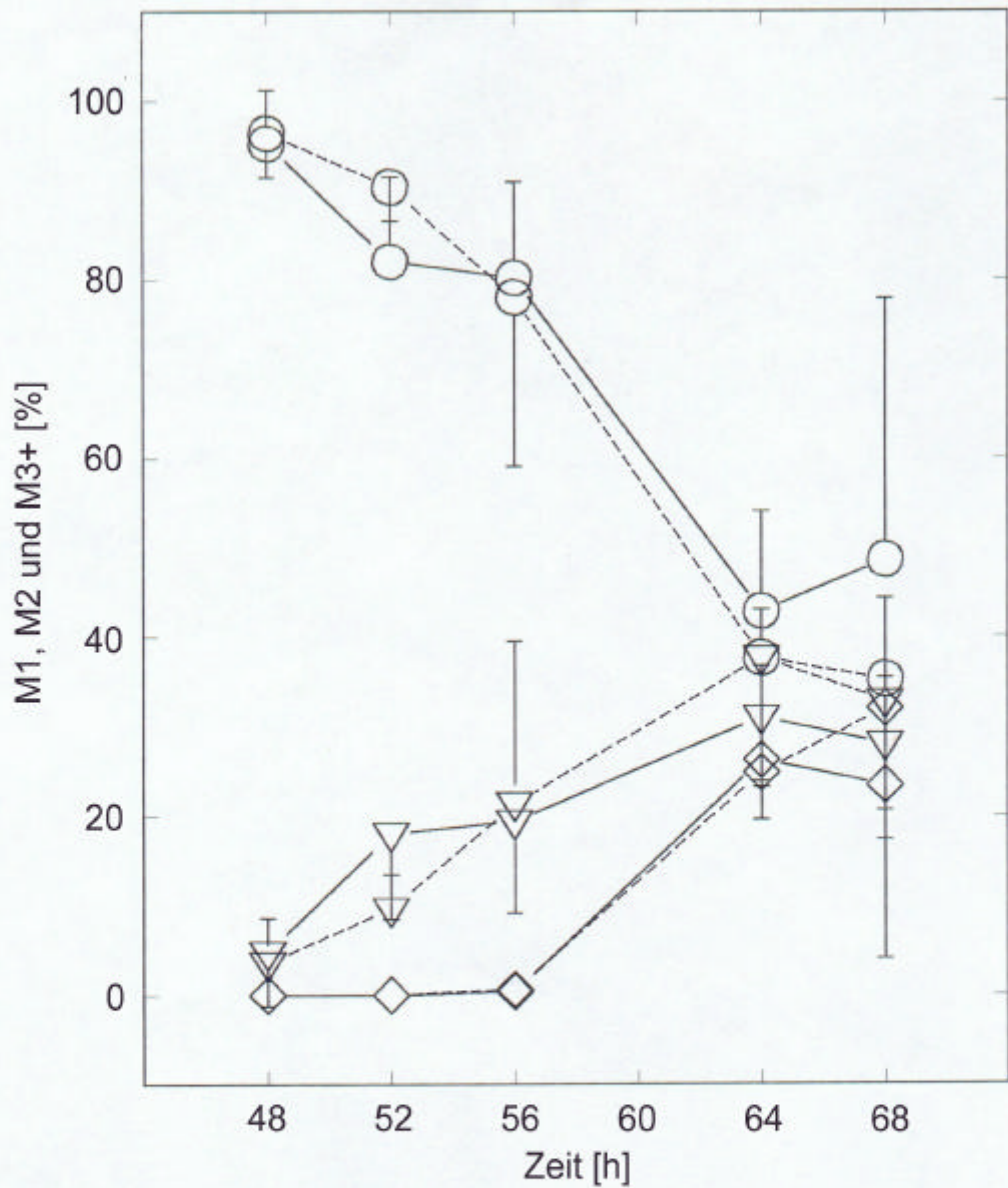
—— ohne Feld (Kontrolle)

○ M1

▽ M2

◇ M3+

Abb. 10



Prozentuale Anteile von M1, M2 und M3+ in HPL, kultiviert in Gegenwart oder Abwesenheit eines Feldes von 5 mT nach den ersten 24 Stunden.

----- Mit Feld (Exposition)

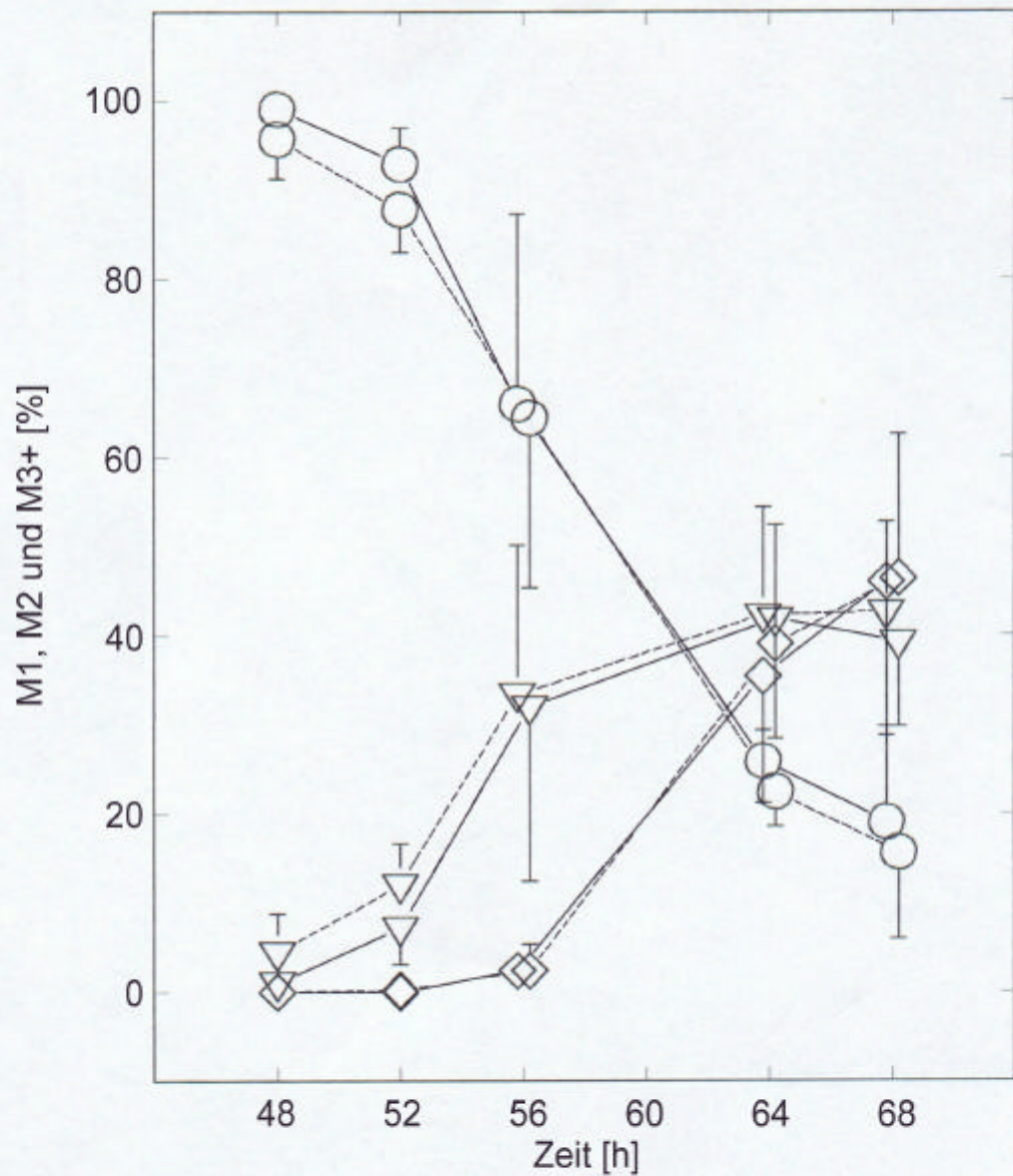
—— ohne Feld (Kontrolle)

○ M1

▽ M2

◇ M3+

Abb. 11



Prozentuale Anteile von M1, M2 und M3+ in HPL, kultiviert in Gegenwart oder Abwesenheit eines Feldes von 0,5 mT.

----- Mit Feld (Exposition)

—— ohne Feld (Kontrolle)

○ M1

▽ M2

◇ M3+

Abb. 12

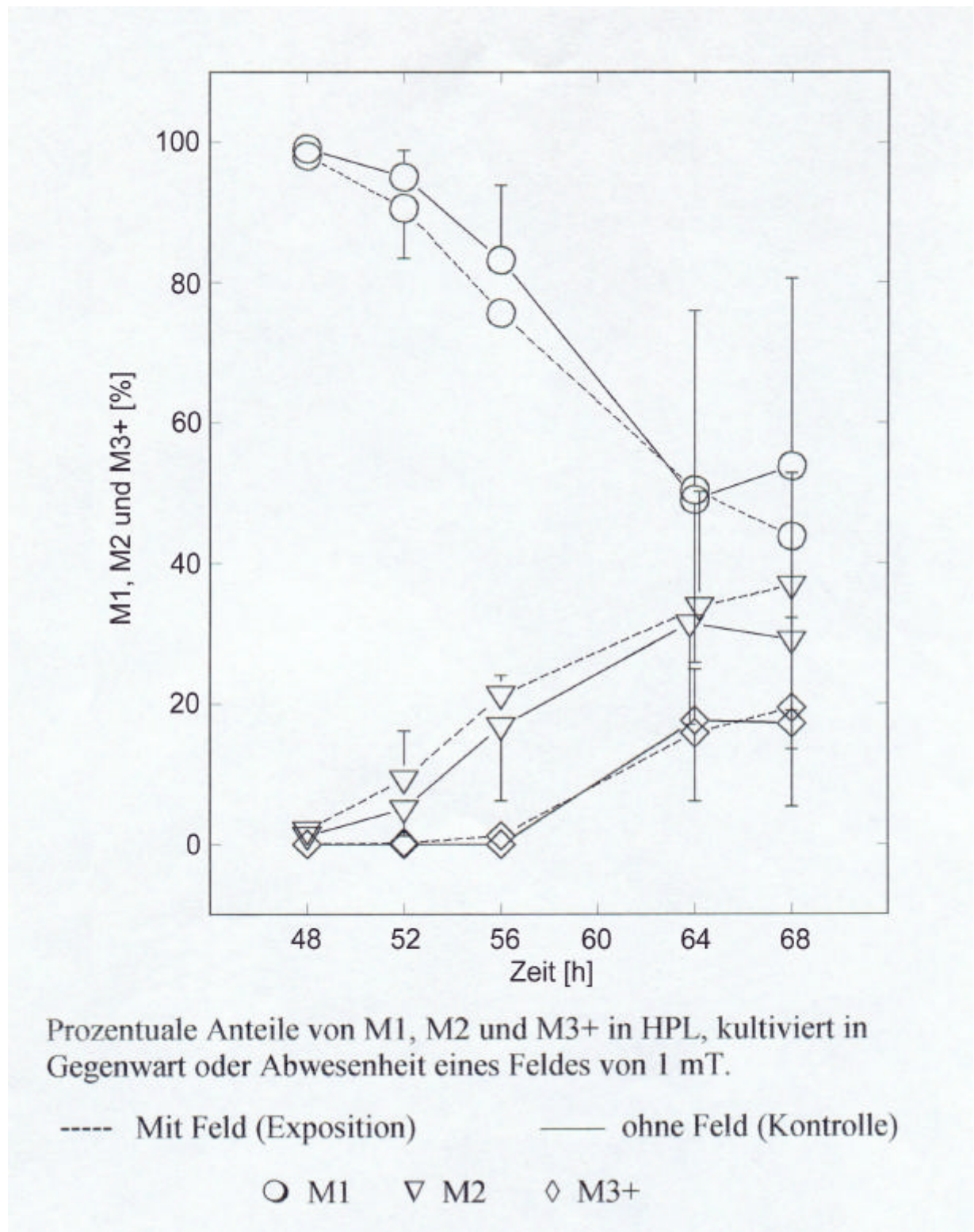
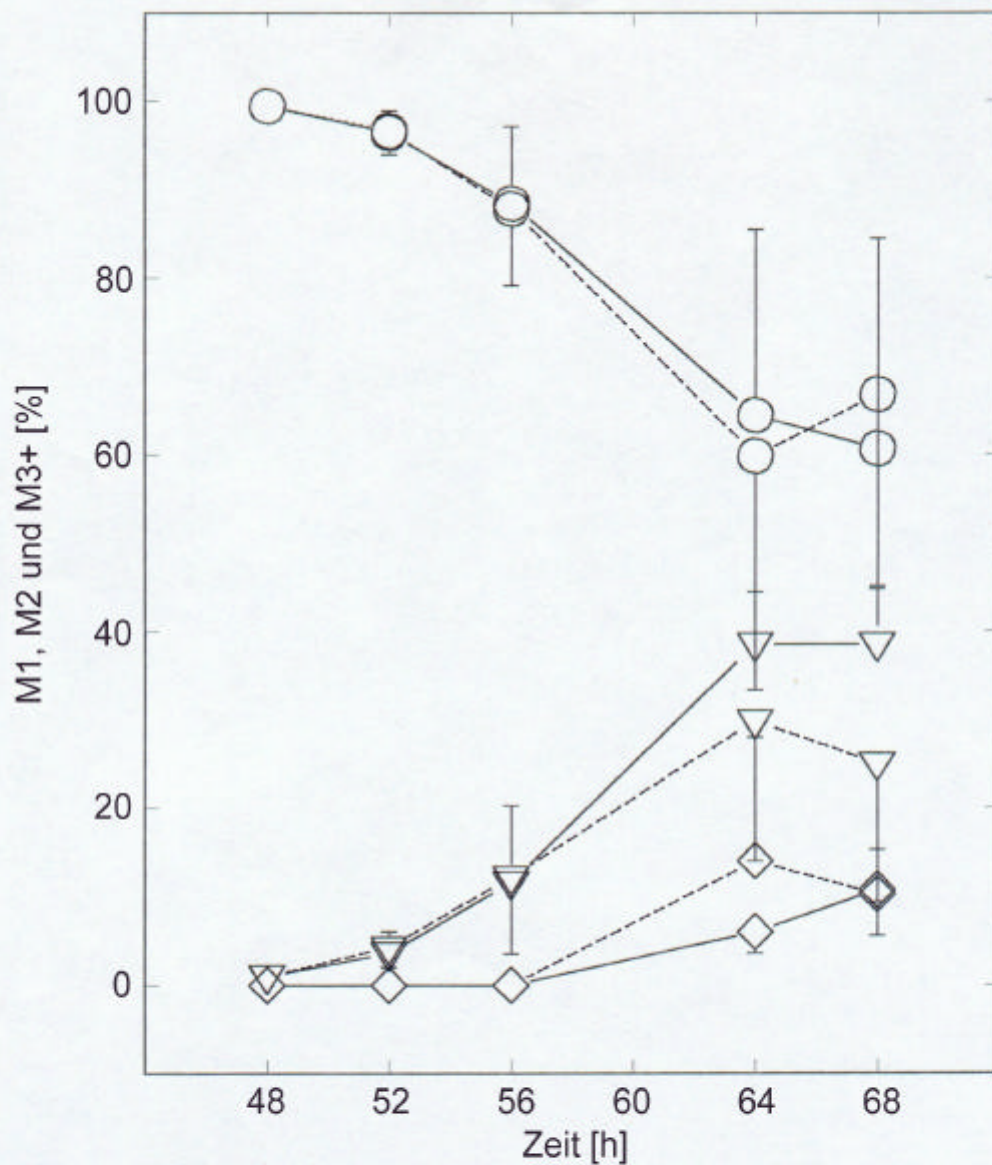


Abb. 13



Prozentuale Anteile von M1, M2 und M3+ in HPL, kultiviert in Gegenwart oder Abwesenheit eines Feldes von 2 mT.

----- Mit Feld (Exposition)

—— ohne Feld (Kontrolle)

○ M1 ▽ M2 ◇ M3+

Abb. 14: Effekte von EMF auf M1 (links) und M2 Mitosen (rechts): Differenzen (Δ) zwischen befeldeten und Kontrollkulturen für die Versuche mit 5 mT Befeldung über den gesamten Zeitraum (oben), für die ersten 24 Std. (Mitte) und nach den ersten 24 Std. (unten) Kulturzeit.

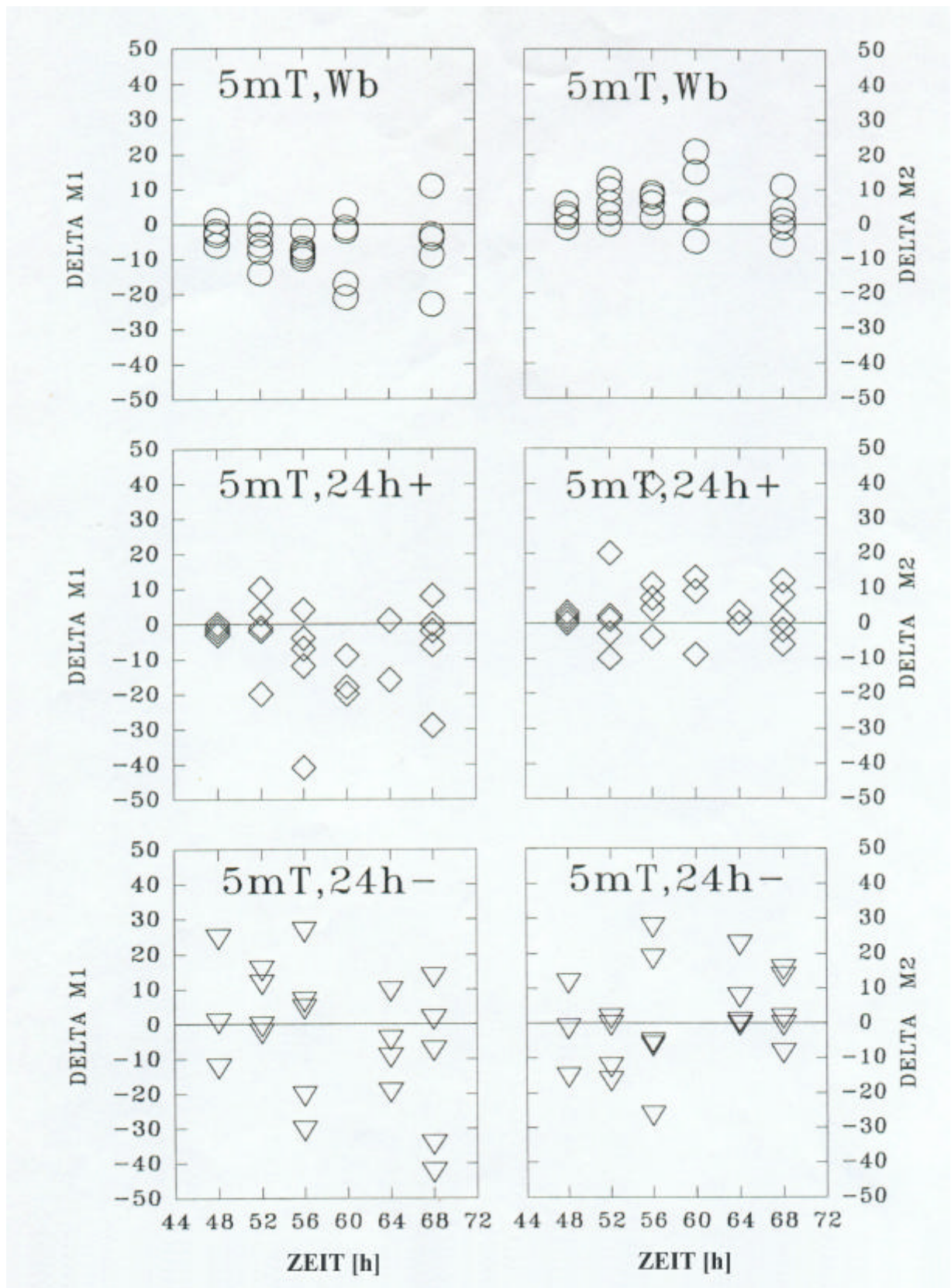
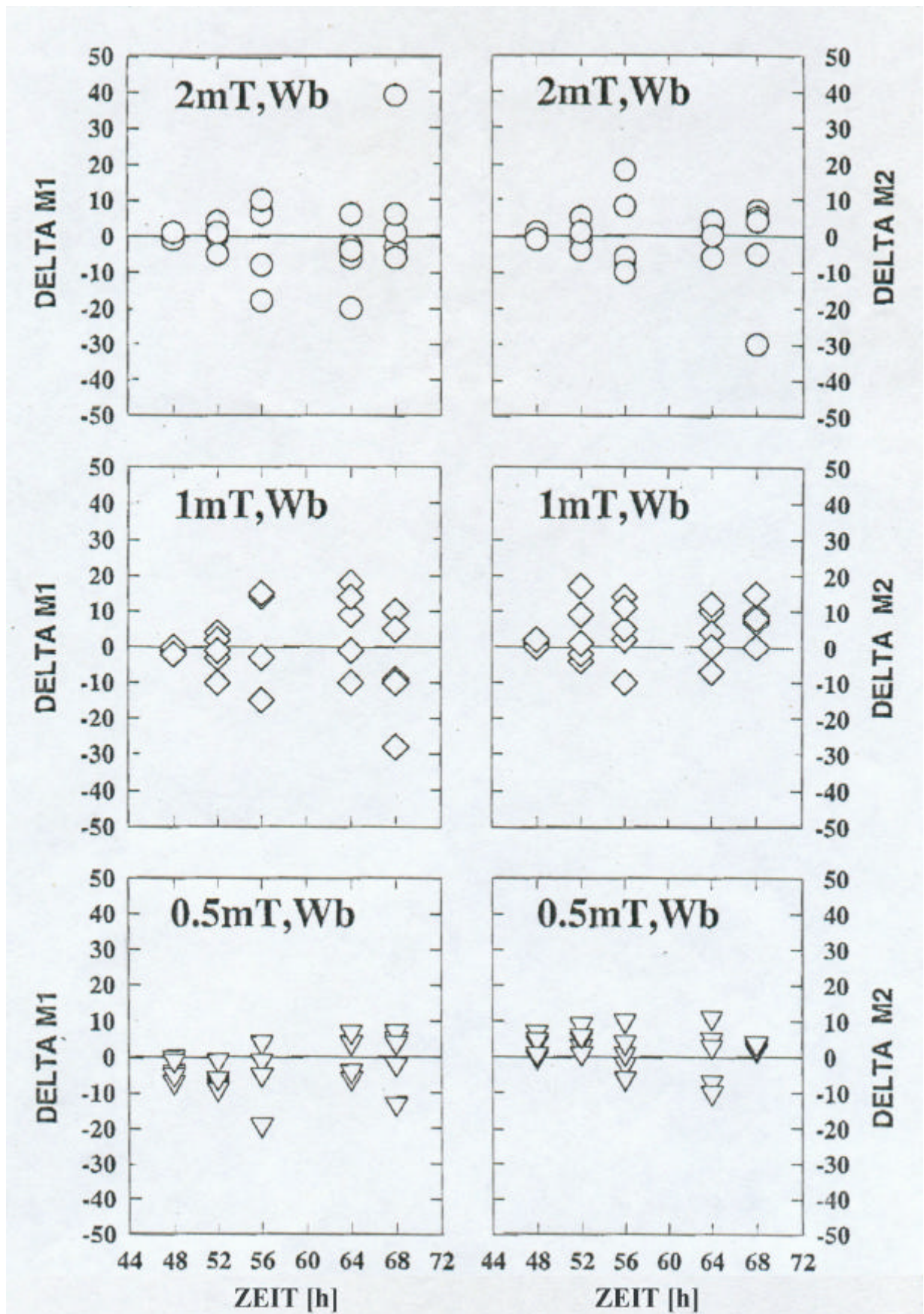


Abb. 15: Effekte von EMF auf M1 (links) und M2 Mitosen (rechts): Differenzen (Δ) zwischen befehlenden und Kontrollkulturen für die Versuche mit 2 mT (oben), 1 mT (Mitte) und 0,5 mT (unten).



3.1.2 Einfluß elektromagnetischer Felder in Kombination mit Calciumantagonisten

Bei diesen Experimenten, in denen neben der Befeldung mit 1 oder 5 mT gleichzeitig eine Behandlung mit Nifedipin (50µM) durchgeführt wurde, verschwanden die signifikanten Effekte auf den Zellzyklus bei Zugabe des Calciumantagonisten. In den nur befeldeten Kontrollkulturen bestätigten sich jedoch die zuvor gefundenen Zellzyklusbeschleunigungen unter Feldeinfluß (Abb. 16-Abb. 20; Tabelle 2).

Tabelle 2: Einflüsse elektromagnetischer Felder verschiedener Flußdichte (1 bzw. 5 mT) in Kombination mit 50 µM Nifedipin auf die Differenzen (Δ) von M1-, M2- und M3+ -Zellen.

Exposition	1 mT Nif. +	1 mT Nif.-Kontr.	5 mT Nif. +	5 mT Nif.-Kontr.
M1	ns	s	ns	s
M2	ns	s	ns	s
M3+	ns	ns	ns	ns

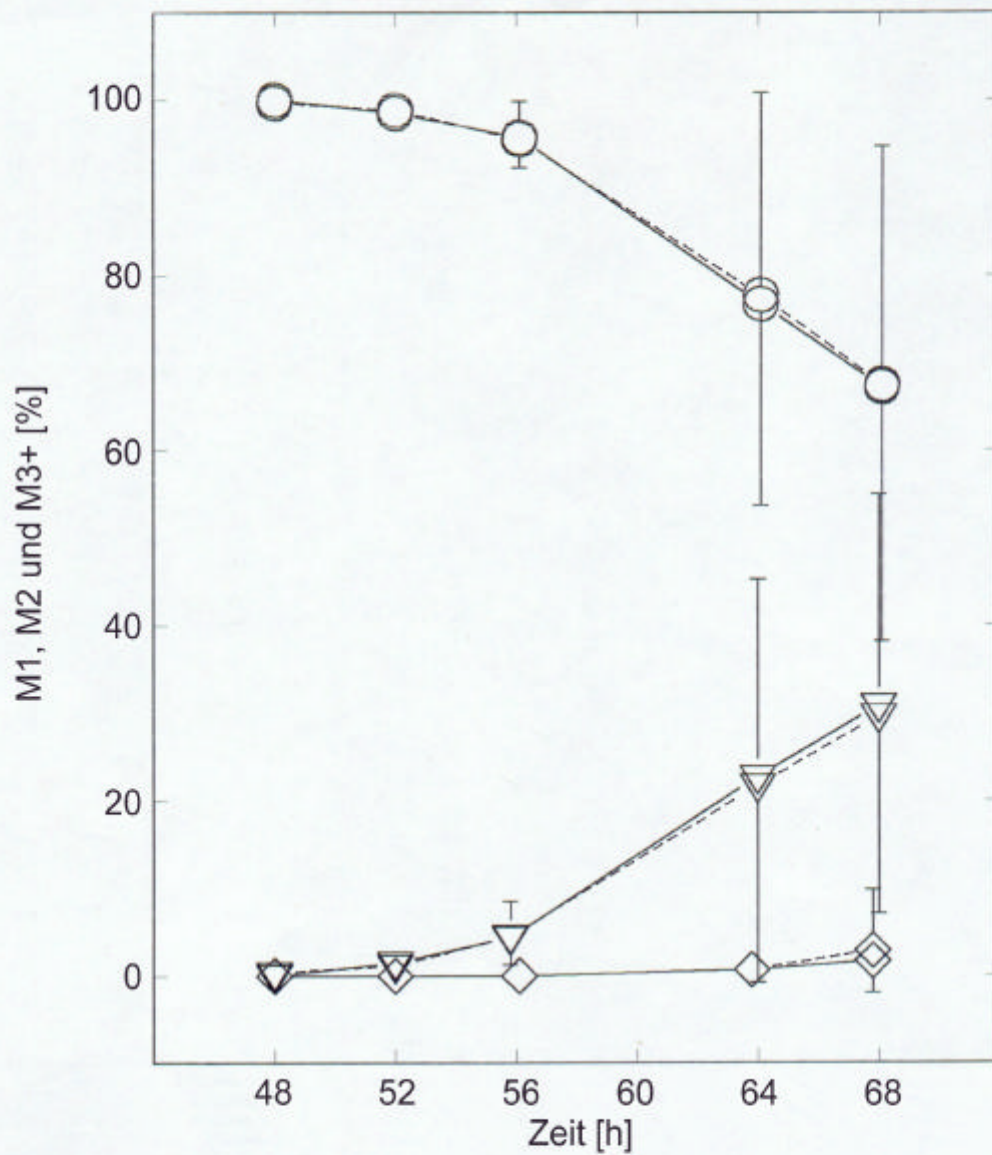
Die statistische Analyse bezüglich Unterschieden zwischen befeldeten und Kontrollkulturen (Δ_{ij}) waren signifikant "negativ" für M1 und signifikant "positiv" für M2 und M3+. Der verwendete Test wurde mit dem zeitunabhängigen Δ_{ij} durchgeführt, wobei berücksichtigt wurde, wie weit Δ_{ij} von 0 abweicht.

s = Unterschiede signifikant auf dem 1 % Niveau; ns = nicht signifikant

Nif. = Zellkulturen mit Befeldung und Nifedipinbehandlung

Nif.-Kontr. = entsprechende Kontrollen ohne Nifedipinbehandlung, nur mit Befeldung

Abb. 16



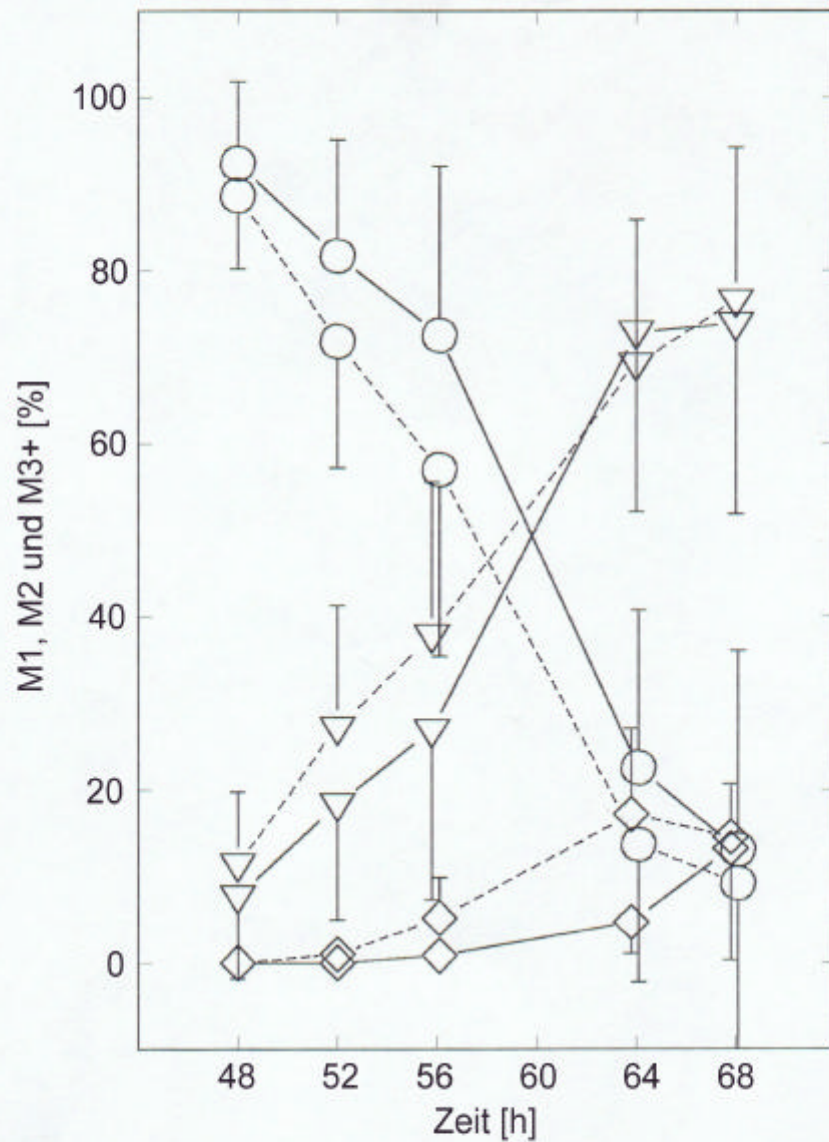
Prozentuale Anteile von M1, M2 und M3+ in HPL, kultiviert in Gegenwart oder Abwesenheit eines Feldes von 1 mT und 50 μ M Nifedipine.

----- Mit Feld (Exposition)

—— ohne Feld (Kontrolle)

○ M1 ▽ M2 ◇ M3+

Abb. 17



Prozentuale Anteile von M1, M2 und M3+ in HPL, kultiviert in Gegenwart oder Abwesenheit eines Feldes von 1 mT. Kontrollen zu den Nifedipine-Versuchen.

----- Mit Feld (Exposition)

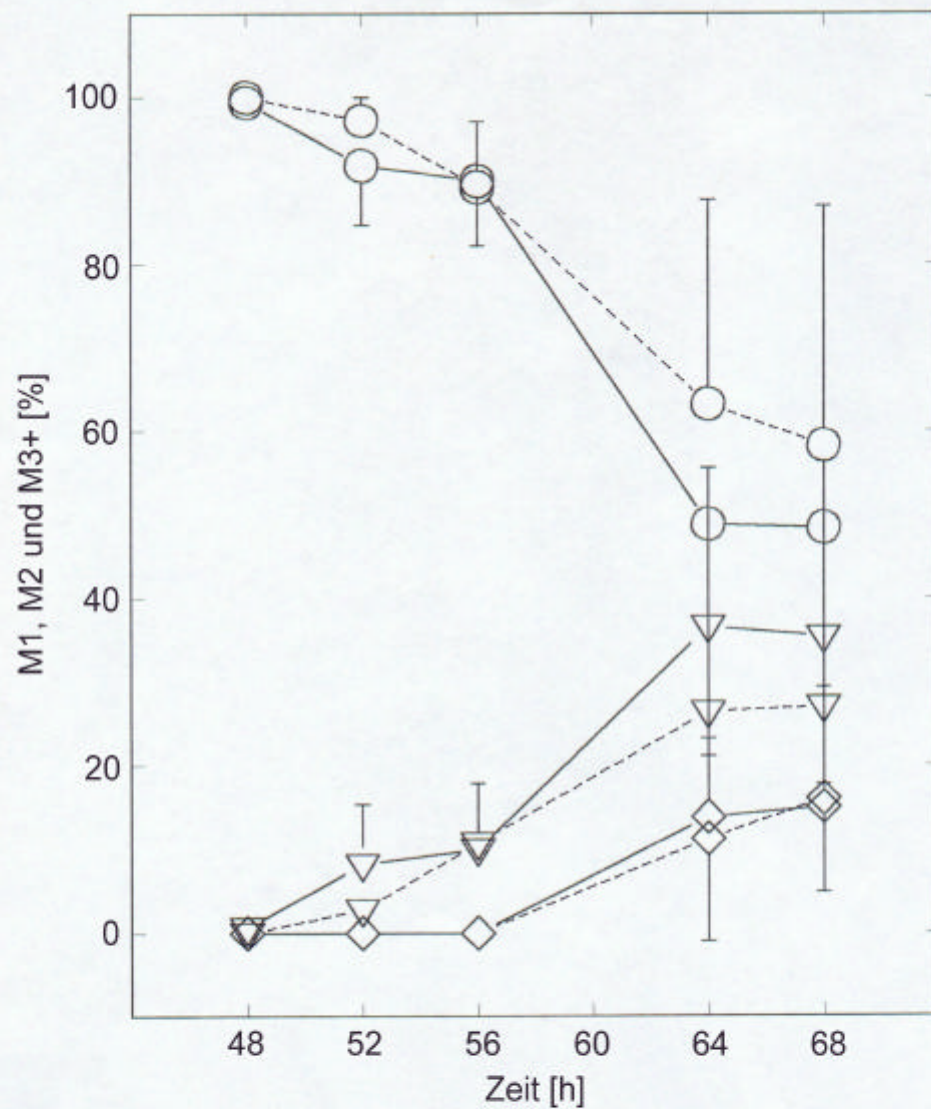
—— ohne Feld (Kontrolle)

○ M1

▽ M2

◇ M3+

Abb. 18



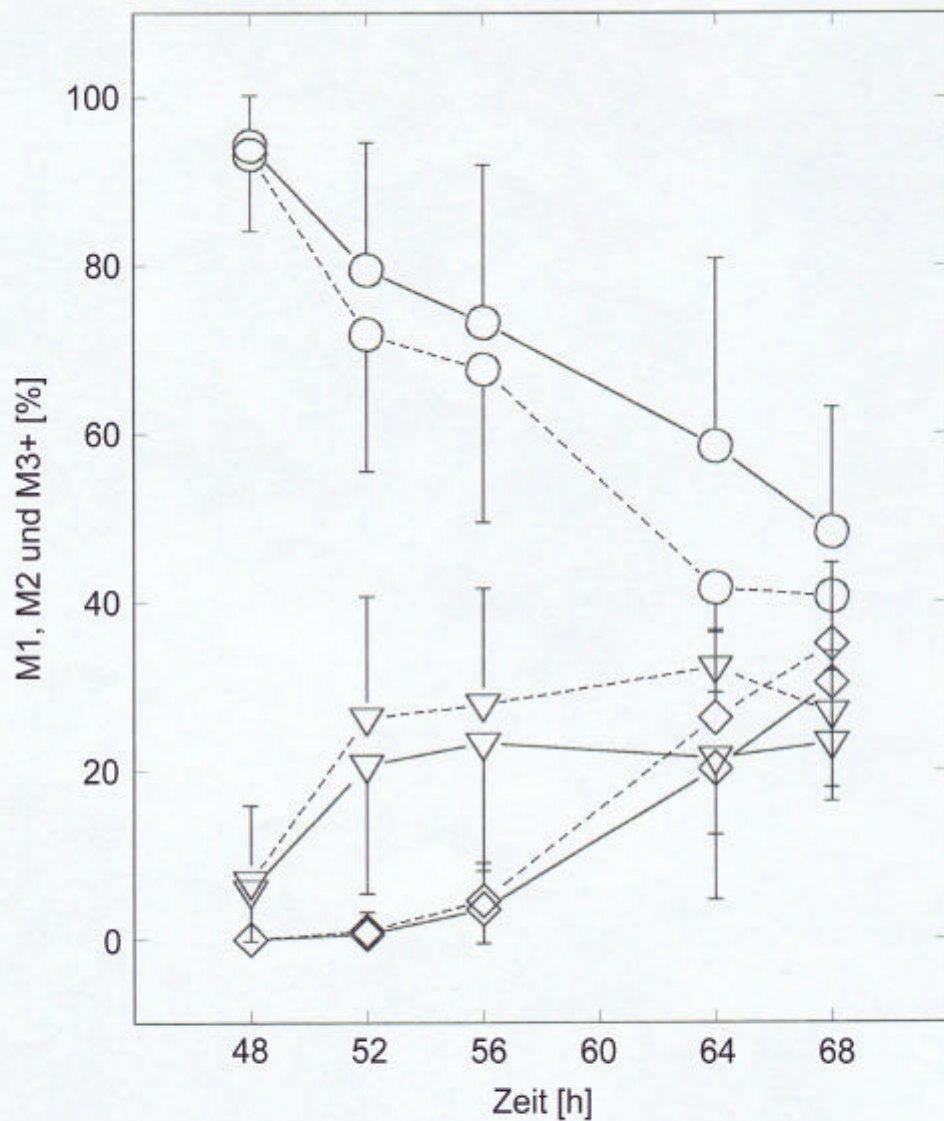
Prozentuale Anteile von M1, M2 und M3+ in HPL, kultiviert in Gegenwart oder Abwesenheit eines Feldes von 5 mT und 50 μ M Nifedipine.

----- Mit Feld (Exposition)

— ohne Feld (Kontrolle)

○ M1 ▽ M2 ◇ M3+

Abb. 19



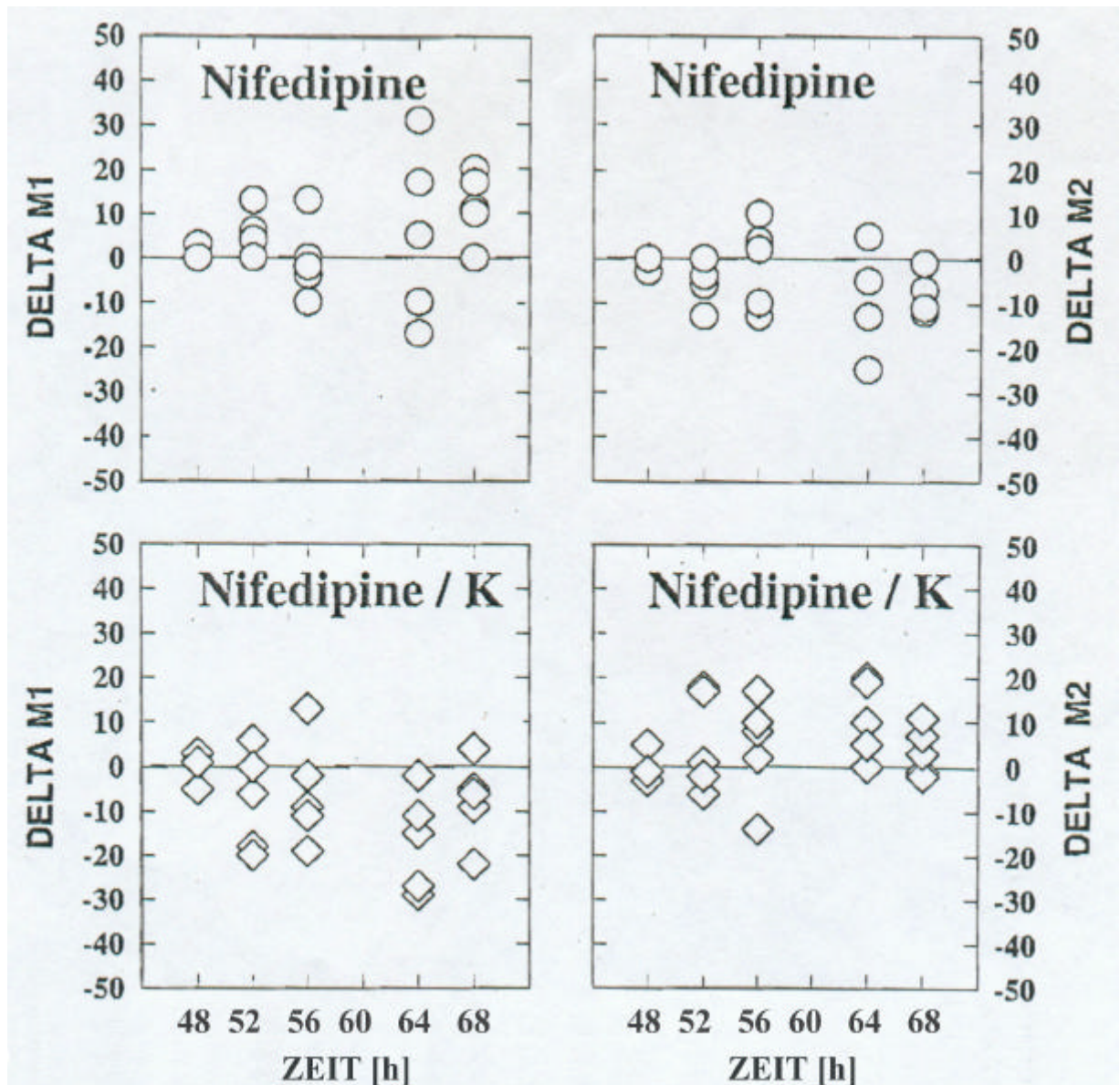
Prozentuale Anteile von M1, M2 und M3+ in HPL, kultiviert in Gegenwart oder Abwesenheit eines Feldes von 5 mT. Kontrollen zu den Nifedipine-Versuchen.

----- Mit Feld (Exposition)

—— ohne Feld (Kontrolle)

○ M1 ▽ M2 ◇ M3+

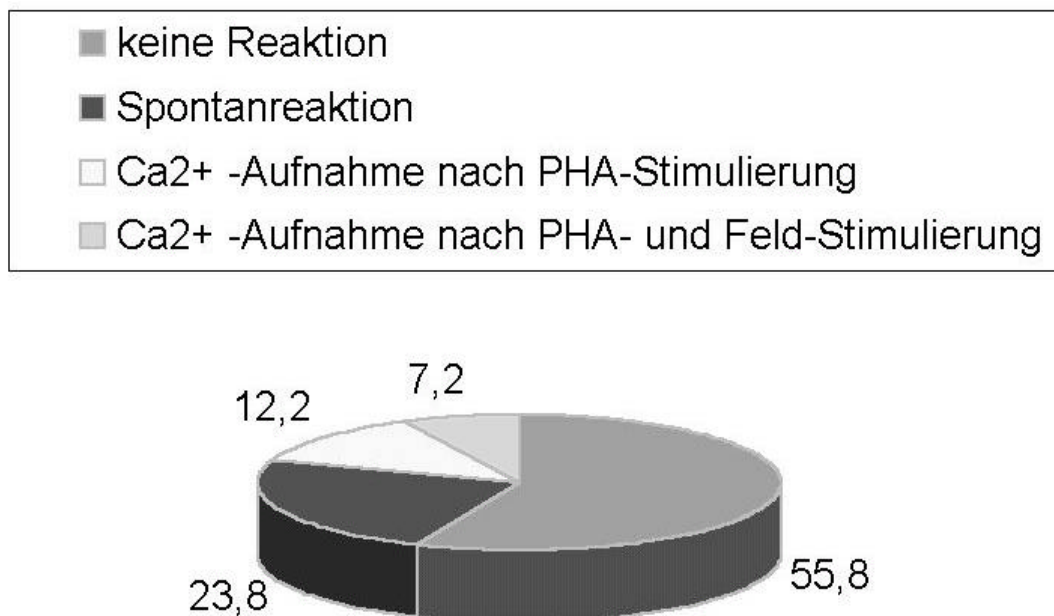
Abb. 20: Effekte von EMF auf M1 (links) und M2 Mitosen (rechts): Differenzen (Δ) zwischen befeldeten und Kontrollkulturen für die Versuche mit kombinierter 5 mT Befeldung und Nifedipinbehandlung (oben) und alleiniger 5 mT Befeldung (unten). Die Versuche mit 1 mT Befeldung waren diesen sehr ähnlich.



3.2 Versuche zum Einfluß von EMF auf den Calciumhaushalt einzelner Zellen

Diese Versuche, die an 265 einzelnen isolierten Lymphozyten durchgeführt wurden, zeigten nur in 7,2 % aller Fälle einen Effekt, der möglicherweise einen Einfluß von EMF auf die Ca^{2+} -Konzentration in den Zellen darstellt. In 13,2 % der Zellen ist eine Reaktion auf die Zugabe von PHA zu beobachten. Diese beiden Prozentzahlen ergeben zusammen jedoch weniger als die Prozentzahl an Zellen, die einen spontanen Anstieg an Ca^{2+} unter Kontrollbedingungen zeigen (23,8%). Die Mehrheit der Lymphozyten (55,8%) zeigte keinerlei Reaktion auf sowohl PHA- als auch EMF-Behandlung.

Abb. 21: Prozentsatz von HPL mit spontanem oder induziertem Anstieg des intrazellulären Calciums $[\text{Ca}^{2+}]_i$.



3.3 Versuche zum Einfluß von EMF auf den Calciumhaushalt von Zellpopulationen

3.3.1 Einfluß von EMF auf den Calcium-Influx

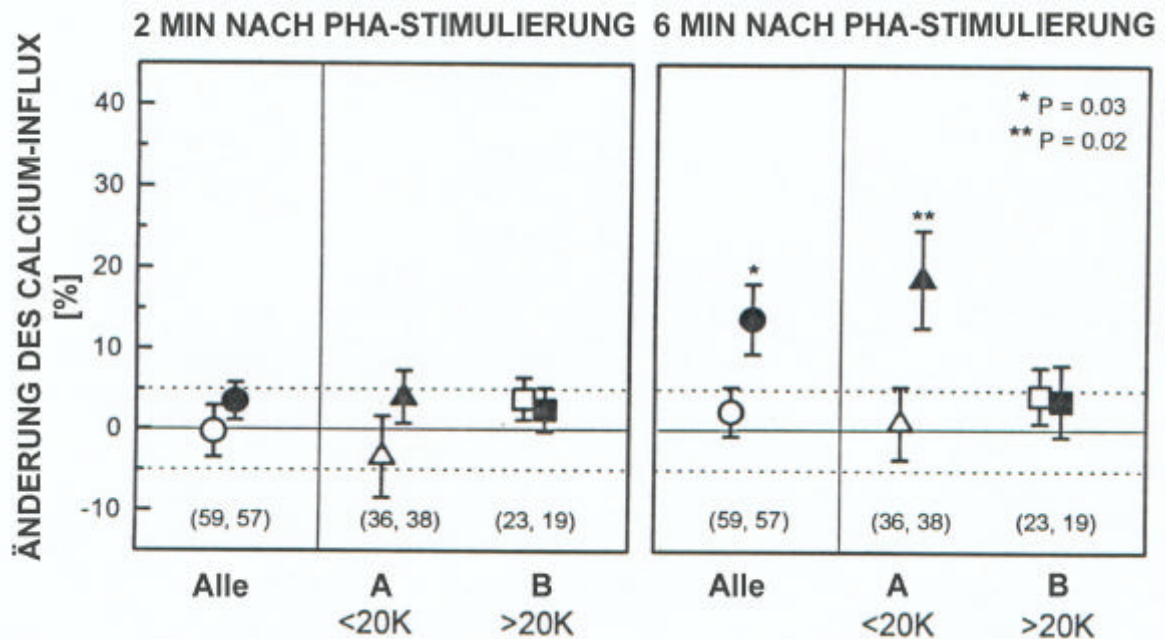
Diese Versuche wurden, wie in Material und Methoden 3.1 beschrieben, mit Mn^{2+} als Maß für die Ca^{2+} -Influxrate in die Zellen durchgeführt. Die experimentellen Ergebnisse von 59 "Sham/Sham" und 57 "Sham/Exposition" Versuchen mit dem DRFS zeigen, daß der Einfluß von EMF auf die Mn^{2+} -Influxrate in menschlichen Lymphozyten stark vom ursprünglichen "Biostatus" der Zellproben abhängt. Dieser wird durch Messung der Grund- Mn^{2+} -Influxrate für 60 Sek vor Feldexposition bestimmt.

Wie man in Abb. 22 erkennen kann, war der "Biostatus" der Zellen für die Beobachtung von Feldeffekten (50 Hz, 1 mT) von großer Bedeutung. Lymphozyten mit hohen Grundinfluxraten, d.h. mit Mn^{2+} bedingten "Quenchingraten" von >20 K (Photon counts/Sek/Min) zeigten keinen EMF bedingten Effekt, wohingegen Zellpräparationen mit niedrigen Grundinfluxraten (<20 K) eine feldbedingte Reaktion zeigten.

Ein zweiter wichtiger Einfluß auf das Zellverhalten war die Stimulation mit dem Mitogen PHA. In der linken Graphikhälfte der Abb. 22 ist die Änderung der Mn^{2+} -Influxraten für ruhende, nicht aktivierte Zellen dargestellt. Für beide Zellproben (mit hoher bzw. niedriger Grundinfluxrate) ist der Unterschied zwischen Sham/Sham und Sham/Expositions-Versuchen nach 2 Min Feldexposition nicht signifikant unterschiedlich. Dies ändert sich, sobald den feldexponierten Zellproben PHA zugegeben wird (Abb. 22, rechte Graphikhälfte). Nach 6 Min kombinierter Mitogen/Feldexposition zeigen Zellen mit niedriger Grundinfluxrate einen signifikanten Anstieg der Mn^{2+} -Influxrate ($p=0,02$). Zellen mit hoher Grundinfluxrate dagegen zeigen immer noch keine Reaktion auf die EMF-Exposition, wodurch die Signifikanz im Anstieg der Mn^{2+} -Influxrate für alle Zellproben auf $p=0,03$ sinkt.

Zusammenfassung: Effekte von EMF auf den Ca^{2+} (Mn^{2+})-Influx sind Biostatus- und PHA-abhängig. Dies bedeutet, daß Lymphozyten nur dann eine signifikante Änderung in der Mn^{2+} -Influxrate zeigen, wenn sie mit einer niedrigen Grundinfluxrate beginnen und wenn sie gleichzeitig mit der Feldbehandlung eine Stimulation mit PHA erfahren.

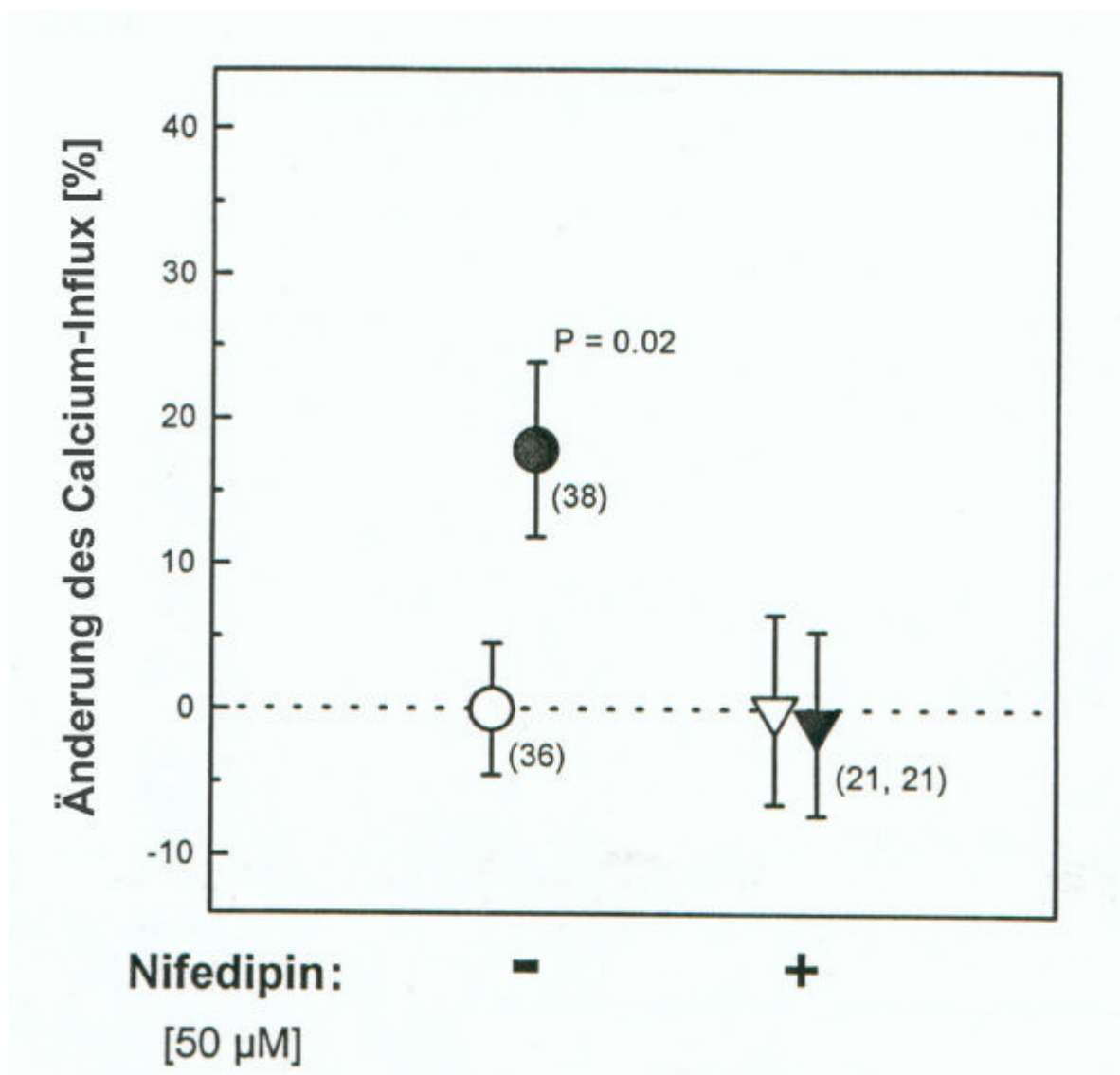
Abb. 22: Effekte von EMF (1 mT) auf die Mn^{2+} -Influxraten menschlicher Lymphozyten im Ruhe- und im stimulierten Stadium. Die Ergebnisse werden als Mittelwert mit SEM dargestellt. K= Influxrate in Photoncounts/Sek/Min. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Versuche für den jeweiligen Versuchspunkt an. A: Zellen mit niedriger Basisinfluxrate, B: Zellen mit hoher Basisinfluxrate. Leere Symbole: Sham/Sham Kontrollen, gefüllte Symbole: Exposition/Sham Versuche



3.3.2 Einfluß von EMF in Verbindung mit dem Calciumantagonisten Nifedipin

Im einem zweiten Versuchsansatz (Abb. 23) wurden die Zellen dem EMF in Gegenwart des Calciumantagonisten Nifedipin ausgesetzt (50 μ M). Es zeigte sich, daß Nifedipin die Erhöhung der Influxrate durch das Feld in PHA stimulierten Zellen unterdrückt (Inhibition). EMF bedingte Effekte auf den Ca^{2+} -Influx sind somit Antagonist- und PHA-abhängig. Der Einfluß des Biostatus wurde durch das Nifedipin ausgeglichen.

Abb. 23: EMF Expositions- (1 mT) und Nifedipin-Effekte auf Mn^{2+} -Influxraten in ruhenden und stimulierten menschlichen Lymphozyten. Die Ergebnisse sind als Mittelwert mit SEM dargestellt. K = Influxrate in Photoncounts/Sek/Min. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Versuche für den jeweiligen Versuchspunkt an. Leere Symbole: Sham/Sham Kontrollen, gefüllte Symbole: Exposition/Sham Versuche



4 Diskussion

Elektromagnetische Felder (EMF) sind aus unserer technisierten Welt nicht mehr wegzudenken. Die weit verbreitete Bezeichnung "Elektrosmog" für derartige Felder weist auf die Ängste in der Bevölkerung vor möglichen schädlichen Wirkungen von EMF hin. Besonders die teilweise reißerischen Berichte in der Presse über mögliche krebsinduzierende Wirkungen von EMF haben diese Ängste geschürt und zu erheblichen Forschungsaktivitäten zu Wirkungen von EMF auf den Menschen geführt. Diese Arbeiten decken ein breites Spektrum an Untersuchungsobjekten und Feldfrequenzen ab: ganze Organismen (Ratten, Mäuse), aber auch Bakterien, Tier- und Pflanzenzellen wurden exponiert. Systematische Untersuchungen an einfachen Systemen sind dagegen eher selten. Die vorliegende Arbeit liefert einen Beitrag in diesem Bereich.

Wird Krebs von einem Agens direkt induziert, spricht man von "Krebsinitiation", erfolgt die Wirkung auf indirektem Weg, spricht man dagegen von "Krebspromotion". Krebsinitiiierende Wirkungen beruhen oft auf der Induktion von Mutationen, also Schädigungen des Erbmaterials. Hierzu gibt es eine ganze Reihe von Untersuchungen mit EMF, die überwiegend negative Ergebnisse vorweisen (Murphy et al., 1993; McCann et al., 1993). Eine krebsinitiiierende Wirkung als Ursache erscheint daher eher unwahrscheinlich.

Promovierende Wirkungen können beispielsweise darauf beruhen, daß der Zellzyklus beeinflußt wird. Schäden in der DNA werden besonders in der G₁-Phase des Zellzyklus repariert, womit vermieden wird, daß die geschädigte DNA repliziert wird. Geschieht dies nicht, kann es zu Mutationen, besonders zu Chromosomenaberrationen kommen, die Krebs induzieren können. Schäden in der DNA bedingen auch oft eine Verlängerung der G₁-Phase, wodurch die Zellen mehr Zeit für die Reparaturen der Schäden gewinnt. Würde man den Zellzyklus beschleunigen, könnte dies zu einer Erhöhung der Mutationsrate und somit des Krebsrisikos führen.

4.1 Untersuchungsergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die nach epidemiologischen Studien (Wertheimer et al., 1979, Savitz et al., 1988; Savitz et al., 1994) und teils widersprüchlichen experimentellen Analysen aufgestellte Hypothese einer tumorpromovierenden Wirkung niederfrequenter elektromagnetischer Felder am Modell menschlicher peripherer Lymphozyten (HPL) bestätigt werden kann, und welcher Mechanismus dafür verantwortlich sein könnte. In

diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, ob der Zellzyklus menschlicher peripherer Lymphozyten in Kultur in Gegenwart elektromagnetischer Felder beschleunigt wird. Die Ergebnisse zeigten, daß dies tatsächlich der Fall ist.

Eine Möglichkeit zur Erklärung dieses Befundes wäre, daß EMF die zelluläre Aufnahme von Ca^{2+} steigern, ein Effekt, der in dieser Arbeit für menschliche Lymphozyten nachgewiesen werden konnte.

Ein von den EMF eventuell ausgehender Temperatureffekt und somit thermische Beeinflussungen der Zellen konnte weitgehend ausgeschlossen werden. Hierzu wurden die experimentellen Aufbauten entsprechend konzipiert.

Zugrunde liegend waren für die vorliegende Arbeit die Publikationen von Rosenthal und Obe (1989) und Cadossi et al. (1985), die erste Hinweise auf eine beschleunigende Wirkung von EMF auf den Zellzyklus von HPL in vitro ergaben, im Gegensatz zu den Publikationen von Conti et al. (1983) und Khalil et al. (1991), in denen eine Inhibierung der Proliferation von HPL gezeigt wurde. Letztere führen ihre Ergebnisse auf mögliche Chromosomen- und DNA-schädigende Wirkungen von EMF und den daraus resultierenden Zelltod zurück, wie sie von D'Ambrosio et al. (1985), Takahashi et al. (1987), Nordenson et al. (1994), Lai et al. (1997) und Ivancsits et al. (2001) für Lymphozyten und andere Zelltypen publiziert wurden. Dem widersprechen Studien von Cohen et al. (1986), Cantini et al. (1987), Rosenthal und Obe (1989) und Scarfi et al. (1994), die keine DNA-Schäden oder Chromosomenbrüche entdecken konnten. In vivo Studien von Bauchinger et al. (1981), und Cohen et al. (1986) unterstützen diese Aussagen. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden keine erhöhten Raten an Chromosomenbrüchen oder Schwesterchromatidaustauschen (SCE) beobachtet, wohingegen die Beschleunigung der Zellproliferation bestätigt werden konnte.

Die Diskrepanzen zwischen epidemiologischen Studien und der Mehrzahl der Laborbefunde (McCann et al., 1993 und 1998; Murphy et al., 1993; Valberg et al., 1997; Repacholi et al., 1999) führten dazu, daß die International Agency for Research on Cancer (IARC) im Jahr 2001 niederfrequenten elektromagnetischen Feldern im Hinblick auf ihre carcinogene Wirkung die Gefahrenstufe 2B (übereinstimmende epidemiologische Studien / widersprüchliche experimentelle Studien und fehlende eindeutige Wirkmechanismen) zuordnete.

Wenn EMF doch mit Krebserkrankungen assoziiert werden können, so muß der zugrunde liegende Mechanismus möglicherweise eher auf der Ebene der Tumor-Promotion und nicht der Tumoren-Initiation liegen. Viele Zelluntersuchungen unterstützen diesen Gesichtspunkt, denn

man kann bei elektromagnetischen Feldern Beeinflussungen von Enzymtätigkeiten, Signaltransduktion, Proteinsynthese und Genexpression beobachten, alles Aktivitäten, die eine Rolle bei der Regulation des Zellwachstums und anderen Prozessen der Tumorgenese spielen. Manche Studien weisen auch darauf hin, dass das genotoxische Potential einiger chemischer Mutagene oder auch ionisierende Strahlung durch Co-Exposition mit EMF beeinflusst sein könnte (McCann et al., 1993 und 1998). Untersuchungen beispielsweise über den Verlauf von Brustkrebskrankungen bei Ratten, die mit krebserregenden Chemikalien vorbehandelt worden waren, deuten auf einen co-promovierenden Effekt von EMF hin (Mevissen et al., 1993, 1995 und 1996; Löschner et al., 1993, 1994 und 1995). Wegen der Verkürzung der Reparaturzeiten könnte bei aufgetretenen DNA-Schäden, wie eingangs erwähnt, auch die in dieser Arbeit gefundene Proliferationsbeschleunigung eine promovierende Wirkung auf die Tumorentstehung haben.

Der Kontrollverlust über den Zellteilungsprozess markiert das Endstadium der Tumorentstehung. Ein wichtiger Faktor ist in diesem Zusammenhang das Hormon Melatonin (Vijayalaxmi et al., 1995). Es wird nachts vom Pinealorgan in den Blutkreislauf abgegeben und wirkt als natürlicher Wachstumshemmer etwa in Brustkrebszellen. Unter Feldeinfluß (50 oder 60 Hz) vermindert sich die Konzentration von Melatonin im Blutplasma und somit sinken auch die onkostatistischen Eigenschaften dieses Hormons (Lerchl et al., 1991; Reiter, 1995). In diesem Zusammenhang wird eine Erhöhung des Brustkrebsrisikos durch Suppression des pinealen Melatonins und einem daraus resultierenden erhöhten Steroidhormonspiegel diskutiert (Stevens et al., 1992 und 1996).

Melatonin wurde ebenfalls als Fänger freier Radikale identifiziert (Reiter, 1995). Diese spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation und der Carcinogenese (Burdon et al., 1989; Rose et al., 1993). Dieser Entdeckung kommt besondere Bedeutung zu, da es Hinweise darauf gibt, daß elektromagnetische Felder das Potential haben könnten die Rekombination freier Radikale in chemischen Systemen zu verändern (Scaiano et al., 1994; Grissom, 1995). Dabei könnten verschiedene Mechanismen den Feldeffekt auf Radikalpaare hervorrufen (Eichwald et al., 1996 und 1997; Walleczek, 1994).

EMF können ihren Einfluß auf die Zellproliferation und Tumorpromotion auch über den Weg der Veränderung von Enzymaktivitäten, wie die der Ornithin-Decarboxylase (ODC) (Litovitz et al., 1991 und 1992), oder in der Wirkung auf die funktionalen Systeme der Zellmembran ausüben. Bei der Weitergabe schwacher elektrischer Signale sind Vorgänge an der Zellmembran beteiligt, die wiederum von externen elektromagnetischen Feldern beeinflusst

werden können. Diese Interaktionen könnten zu biochemischen Reaktionen im Cytoplasma und so zu Veränderungen von Zellfunktionen wie der Zellproliferation führen. Ebenfalls betroffen wäre der Ionentransport. Die Auswirkungen von EMF auf den Ca^{2+} -Transport durch die Zellmembran und die intrazelluläre Konzentration dieses Ions wurde von verschiedenen Autoren beschrieben (Walleczek, 1992; Liburdy, 1992; Lindström et al. 1995). Calcium Ionen spielen als Second Messenger in der Signaltransduktion und damit auch bei der Zellteilung eine wichtige Rolle. Die Konzentration dieser Ionen in der Zelle wird genau reguliert. In hohen Dosen wirkt Ca^{2+} toxisch und aktiviert endogen Endonukleasen, die programmierten Zelltod (Apoptose) auslösen können (Trump et al., 1995).

Nachweise, daß EMF diese Regulation stören, konnten von Walleczek et al. (1990) erbracht werden; sie fanden in Mitogen-stimulierten Lymphozyten nach Feldeinschaltung einen vermehrten Flux von $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ins Zellinnere. Unstimulierte Zellen zeigten dagegen keine Reaktion. Dieses Ergebnis wurde später in Real-Time –Versuchen an Jurkat-Zellen (Walleczek et al., 1993) und von Garcia-Sancho et al. (1994) an Thymozyten bestätigt. Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei den Versuchen mit Lymphozyten-Populationen, daß Effekte von EMF auf den Ca^{2+} -Influx in HPL Biostatus- und PHA-abhängig waren. Dies ist möglicherweise auch eine Erklärung für die widersprüchlichen Ergebnisse bei den Ca^{2+} -Influx-Versuchen mit Einzelzellen, in der nur eine kleine Anzahl an Zellen untersucht werden konnte, die möglicherweise zum größten Teil im unstimulierten Ruhestadium waren und somit den Effekt nicht zeigten.

Um nachweisen zu können, daß Calciumionen für die in dieser Arbeit gefundene Beschleunigung des Zellzyklus (mit)verantwortlich sind, wurde den Kulturen der Calciumantagonist Nifedipin zugegeben. Der vermehrte Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen unter Befeldung blieb in Gegenwart von Nifedipin bei den Ca^{2+} -Influx-Versuchen aus, in den Proliferationsversuchen konnte im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen im Feld keine beschleunigte Zellteilung mehr nachgewiesen werden. Die Suppression der Zellzyklusbeschleunigung wird offensichtlich durch Veränderungen an Membrankanälen hervorgerufen. Nifedipin entwickelt dabei seine antagonistische Wirkung an der extrazellulären Domäne des Calciumkanals. Andere Antagonisten wie Diltiazem und Verapamil wirken an der intrazellulären Domäne des Kanals (Janis et al., 1983). Eine magnetoprotektive Wirkung verschiedener Calciumkanal-Antagonisten auf menschlichen Leukozyten wird von Papatheofanis (1990) beschrieben, wobei Nifedipin am effektivsten war.

4.2 Wirkungsmodelle

Neben der Literatur über Wirkungen auf biologische Systeme stieg die Zahl der Publikationen über Entwicklungen theoretischer Modelle zu Wirkungsmechanismen von derartigen Feldern auf Zellen und Organismen ebenfalls stark an. Das Spektrum der Arbeiten erstreckt sich dabei vom niederfrequenten Bereich der Stromnetze bis in die Hochfrequenz und den Mikrowellenbereich. Allerdings haben bisher die oft recht widersprüchlichen experimentellen Ergebnisse und die Vielfalt der diskutierten Modelle nicht unbedingt zur Klärung der Sachverhalte beigetragen.

In einigen Bereichen werfen die verschiedenen Arbeiten von den Ergebnissen her neue Fragen auf, da sie untereinander nicht eindeutig oder sogar widersprüchlich sind, auch ist es oft schwierig die Effekte in anderen Labors zu reproduzieren.

Zahlreiche mögliche Wirkungsmodelle lassen sich in der Literatur unterscheiden, wobei die Publikationen sowohl theoretische Wirkungsmodelle als auch experimentelle Arbeiten, die solche Modelle zur Interpretation der Ergebnisse nutzen, beschreiben. Einige Modelle bauen dabei unter zusätzlichen Annahmen auf anderen Theorien auf und führten so zu neuen oder gänzlich andersartigen Schlussfolgerungen.

Im Folgenden wird eine Auflistung möglicher Wirkungsmodelle auf Zellen und Organismen im niederfrequenten Wellenbereich kurz zusammengestellt:

4.2.1 - "Ion Cyclotron Resonance" Modell

Gegenstand dieses Modells sind freie Ionen, die sich gemäß charakteristischer Cyclotronfrequenzen im statischen Feld bewegen. Niederfrequente Wellenfelder bringen diese Ionen in resonante Anregung. Relevante Frequenzen liegen im Bereich von 10 bis 800 Hz für Ka^{2+} , Ca^{2+} und H^+ -Ionen (Blackman, 1993; McLeod et al., 1992; Liboff et al., 1990). Bei diesem Modell wird angenommen, daß der Ca^{2+} -Flux über die Zellmembran und / oder die DNA-Replikation beeinflußt werden.

4.2.2 - "Ion Parametric Resonance" Modell

Dieses Modell besagt, daß niederfrequente Magnetfelder mit Ionen interagieren, etwa mit Ca^{2+} Ionen in Ca-bindenden Proteinen. Transitionen zwischen verschiedenen "Zeeman-Zuständen"

können zu einem resonanzartigen Verhalten führen. Experimentelle Ergebnisse, veröffentlicht von Blackman et al. (1994) und Lednev (1991), scheinen dieses Modell zu stützen.

4.2.3 - Magnetomechanische Effekte

Dieses Modell beruht darauf, daß in einigen Zellen Magnetitpartikel biologischen Ursprungs nachgewiesen worden sind. Auf diese ferromagnetischen Teilchen, die an Ionenkanäle in der Membran gebunden sind, könnten magnetische Felder Kräfte ausüben, die über eine Änderung der Kanalaktivität zu zellulären Effekten führen (Kirschvink et al., 1992).

4.2.4 - Zeeman-Stark Modell

Dieses Modell von Chiabrera et al. (1985) beschreibt das Verhalten Protein-gebundener Ionen im statischen geomagnetischen Feld und einem zusätzlichen Wellenfeld im Bereich der Cyclotronresonanz. Komplexe Modellrechnungen in einem Quantenmodell lassen auch bei niedrigen Feldstärken biologische Effekte möglich erscheinen. Diese basieren dann auf dem Zeeman- (magnetische Feldwirkungen) und -Stark-Effekt (elektrische Feldwirkungen). Relevante Frequenzen liegen im Bereich 10 bis 1000 Hz.

4.2.5 - Triplet-Triplet- Austausch Modell

Das Modell beschreibt den Einfluß statischer oder veränderlicher magnetischer Felder auf Moleküle mit einem oder mehreren ungepaarten Elektronen. Diese reaktionsfreudigen Moleküle, freie Radikale und Triplet-Formationen können über feldbedingte resonante Transitionen, ihre Zustände ändern, was dann aufgrund verminderter Rekombinationsraten freier Radikale kinetische Prozesse beeinflussen könnte. Das Modell (Adey, 1993) beschreibt sowohl nichtresonante niederfrequente Wirkungen als auch hochfrequente Resonanzeffekte und weist auf einen möglichen Einfluß magnetischer Felder auf spin-abhängige chemische Reaktionen hin.

4.2.6 - Surface Compartment Modell

Dieses Modell beschreibt den möglichen Einfluß von EMF auf den Ionen-Transport über die Zellmembran und die dabei beteiligten Proteine. Niederfrequente Anregungen führen demnach zu einer Veränderung des Zellstoffwechsels über die Beeinflussung von Form und Funktion

der Rezeptormoleküle und somit zur Beeinflussung der Signalwege, über die Zellen miteinander kommunizieren (Blank et al., 1987; Blank, 1992).

4.2.7 - Nicht lineare Dynamik zellulärer Systeme

Ein zelluläres System wird als nichtlinearer Oszillator fernab des thermodynamischen Gleichgewichtes beschrieben. Nichtthermische Wirkungen schwacher elektromagnetischer Felder könnten über die Beeinflussung biochemischer Prozesse in der Zellmembran zustande kommen. Damit verbunden sollen schwache elektromagnetische Felder über diese Prozesse soweit verstärkt und in die Zelle eingekoppelt werden, daß nachweisbare zelluläre Effekte auftreten. Kopplungsmechanismen können auf einer Beeinflussung der Aktivierung von Proteinen über Rezeptoren oder eine Veränderung der Reaktionskinetik von Radikal-Paar-Reaktionen in den Zellen beruhen.

4.2.8 - "Radical Pair" Mechanismus

Der Radical Pair Mechanismus könnte eine physikalische Erklärung dafür sein, wie magnetische Felder, deren Energieeinträge ein vielfaches schwächer sind als die durchschnittliche thermische Energie (kT), die Reaktionen intrazellulärer Radikale beeinflussen können.

Die Überlegungen, die dem Modell des Radical Pair Mechanismus zugrunde liegen, beruhen auf der Rolle des Elektronenspin in chemischen Reaktionen.

Radikale sind Atome oder Moleküle mit einem oder mehreren ungepaarten Elektronen, was sie zu hochreaktiven Reagenzien macht. Die Reaktionsfreudigkeit von Radikalen miteinander wird bestimmt von dem Spinzustand ihrer äußeren Elektronen (paralleler Spin "Triplet State", antiparalleler Spin "Single State"). Ihre chemische Reaktion ist somit Spin-selektiv. Der Schlüssel zum Verständnis des Radical Pair Mechanismus ist der Befund, daß Befeldung mit statischen oder niederfrequenten Feldern den Spinzustand eines Radikals verändern kann und so auch Radikal-abhängige biochemische Reaktionsabläufe. Bislang sind einige Radikal-abhängige Reaktionen in der Zelle bekannt, etwa Reaktionen, die T-Zell Signaltransduktionen beeinflussen könnten (Schreck et al., 1991, Dornand et al., 1989, Maly et al., 1990).

Der Einfluß magnetischer Felder auf Radikal-abhängige biochemische Reaktionsraten könnte grundsätzlich Änderungen in zellulären Regulationsmechanismen und Funktionen bedingen. Weiterhin wurden klassische und quantenmechanische mathematische Modelle entwickelt, um

die Magnetfeldeffekte über den Radical Pair Mechanismus auf chemische und biochemische Reaktionen zu beschreiben (Salikhov et al. 1984; Eichwald et al., 1996).

Für einige organochemische Reaktionen konnten die quantitativen Vorhersagen des Modells experimentell belegt werden (Weller et al., 1983). Die so erhärteten Vorstellungen erstreckten sich bis zu Magnetfeldintensitäten von 0,5 bis 2 mT.

Zur Zeit besteht noch kein direkter Beweis für die Richtigkeit des Radical Pair Mechanismus in Bezug auf Magnetfeldeffekte in lebenden Zellen. Es konnte aber bereits nachgewiesen werden, daß bestimmte biochemische Effekte in vitro durch Magnetfelder mittels des Radical Pair Mechanismus beeinflusst werden können. Es handelt sich hierbei um Magnetfeldeffekte auf Biolumineszenzreaktionen (Tribel et al., 1986), Cytochrom C-oxidase Aktivität (Nossol et al., 1993) und den Vitamin B₁₂-Cofaktor Methylcob(III)alamin.

Keine der obigen Theorien konnte bisher in verschiedenen Systemen und widerspruchsfrei bestätigt werden, es bleibt daher weiterhin unklar, ob EMF athermische Wirkungen auf Organismen haben und wie diese entstehen könnten. Rein physikalisch reichen die Energieeinträge von EMF nicht aus, um die gefundenen Wirkungen direkt hervorzurufen. Allerdings bleibt zu bedenken, daß biologische Systeme Verstärkermechanismen besitzen, die dazu führen können, daß kleinste Ursprungseffekte zu großen Wirkungen führen.

Die Befunde zur Calcium-Aufnahme lassen vermuten, daß EMF Membrankanäle beeinflussen können. Diese Ergebnisse lassen sich mit keiner der obigen Theorien erklären. Alle diese Theorien setzten athermische Wirkungen von Felder voraus - ob EMF nichtthermische Wirkungen auf Zellen ausüben kann ist bisher jedoch nicht eindeutig nachgewiesen. Auch Versuchsaufbauten die eine Erwärmung von Zellen verhindern sollen, können dennoch eine thermische Wirkung nicht vollständig ausschließen.

Die Frage nach einer möglichen schädigenden Wirkung von EMF muß somit weiter offen bleiben.

4.3 Hochfrequenzfelder (HFEMF)

In einer nicht in diese Arbeit eingebundenen Untersuchung wurden HFEMF-Effekte von 380 MHz (Polizeifunk), 900 MHz (D-Netz) und 1800 MHz (E-Netz) auf das Proliferationsverhalten menschlicher Lymphozyten untersucht. Der Versuchsablauf war identisch mit dem hier weiter oben beschriebenen: Zellen, Kulturbedingungen und Kultivierungsdauer waren vergleichbar. Lediglich die Exposition der Zellen fand in einem Holleiter statt und die HFEMF wurde gepulst appliziert. Die im niederfrequenten EMF gefundenen Auswirkungen konnten bei der Hochfrequenzbefeldung jedoch nicht nachgewiesen werden (Antonopoulos et al., 1997).

5 Zusammenfassung

Im ersten Teil der Untersuchungen wurden menschliche Lymphozyten in Vollblutkulturen bis zu 68 Stunden elektromagnetischen Feldern von 50 Hz bei Flussdichten von 0,5 mT, 1 mT, 2 mT und 5 mT ausgesetzt. Die untersuchten Parameter waren Zellteilungszyklus und Proliferationsindex (PI), bestimmt durch Auswertung der erfolgten Mitosedurchgänge (M1, M2 und M3+) zu bestimmten Zeitpunkten nach Kulturbeginn. Für jeden Versuchspunkt wurden in 5 verschiedene Blutproben mindestens 100 Mitosen ausgewertet.

Eine statistisch signifikante Beschleunigung des Teilungszyklus der Zellen von mindestens 5% konnte bei Feldstärken von 0,5 mT, 1 mT, 5 mT und bei Teilzeitbefeldung der ersten 24 Stunden mit 5 mT beobachtet werden. Dieser Effekt trat bei 2 mT und bei Teilzeitbefeldung der Kulturen nach 24 Stunden bei 5 mT nicht auf. Eine Dosis-Wirkungs-Beziehung ließ sich also nicht ableiten.

Bei den Experimenten in denen neben der Befeldung mit 1 oder 5 mT gleichzeitig eine Behandlung mit Nifedipin durchgeführt wurde, verschwanden bei Zugabe des Calciumantagonisten die signifikanten Effekte auf den Zellzyklus.

Der PI war in den exponierten HPL leicht, aber nicht signifikant, erhöht.

Im zweiten Teil der Arbeit, der Untersuchung über EMF-Einflüsse auf den Calciumhaushalt, wurden bei der Beobachtung einzelner HPL keine Effekte, die eindeutig der Befeldung zuzuschreiben waren, nachgewiesen.

Im Gegensatz dazu zeigte sich in HPL-Populationen nach 6 minütiger Befeldung mit 1 mT ein Mitogen-abhängiger erhöhten Influx von Ca^{2+} in jenen Zellen, bei denen vor Versuchsbeginn eine niedrige Ca^{2+} -Grundinfluxrate bestimmt worden war. Zellen mit einer schon erhöhten Grundinfluxrate zeigten dagegen keine Reaktion auf das Feld. Bei Versuchen in Gegenwart von Nifedipin zeigte sich, daß der Calciumantagonist die Erhöhung der Influxrate durch das Feld in Mitogen-stimulierten Lymphozyten unterdrückte.

Aus den hier ermittelten Ergebnissen läßt sich folgern,

- daß die auf epidemiologischen Studien beruhende Vermutung, daß EMF an der Tumorentstehung beteiligt sein könnten, sich mit der gefundenen Zellzyklusbeschleunigung und der dadurch verkürzten Reparaturzeit für DNA-Schäden erklären ließe.

- daß EMF den Ca^{2+} -Influx in bestimmten Zellen steigern, möglicherweise bedingt durch Veränderungen in der Leitfähigkeit von Ionenkanälen in der Zellmembran. Dieser Effekt tritt bei Behandlung mit Calciumantagonisten nicht auf, was die Vermutung stützt, daß der betroffene Endpunkt der Ca^{2+} -Transport durch die Membran ist.

6 Literatur

- Adey WR (1993): Biological effects of electromagnetic fields. *J. Cell. Biochem.* 51: 410-416
- Antonopoulos A, Yang B, Stamm A, Heller WD, Obe G (1995): Cytological effects of 50 Hz electromagnetic fields on human lymphocytes in vitro. *Mutat. Res.* 346: 151-157
- Antonopoulos A, Eisenbrandt H, Obe G (1997): Effects of high-frequency electromagnetic fields on human lymphocytes in vitro. *Mutat. Res.* 395: 209-214
- Bauchinger M, Hauf R, Schmid E, Dresch J (1981): Analysis of structural chromosome changes and SCE after occupational long-term exposure to electric and magnetic fields from 380 kV-systems. *Radiat. Environ. Biophys.* 19: 235-238
- Bean BP (1984): Nitrendipine block of cardiac calcium channels: high-affinity binding to the inactivated state. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 6388-6392
- Blackman CF, Most B (1993): A scheme for incorporating DC magnetic fields into epidemiological studies of EMF exposure. *Bioelectromagnetics* 14: 413-431
- Blackman CF, Blanchard JP, Benane SG, House DE (1994): Empirical test of an ion parametric resonance model for magnetic field interactions with PC-12 cells. *Bioelectromagnetics* 15: 239-260
- Blank M (1987): The surface compartment model: a theory of ion transport focused on ionic processes in the electrical double layers at membrane protein surfaces. *Biochim. Biophys. Acta* 906: 277-294
- Blank M (1992): Na, K-ATPase function in alternating electric fields. *FASEB J.* 6: 2434-2438
- Burdon RH, Rice-Evans C (1989): Free radicals and the regulation of mammalian cell proliferation. *Free Radic. Res. Commun.* 6: 345-358

Cadossi R, Emilia G, Torelli G, Ceccherelli G, Ferrari S, Ruggieri P (1985): The effect of low-frequency pulsing electromagnetic fields on the response of human normal lymphocytes to phytohaemagglutinin (PHA). *Bioelectrochem. Bioenerg.* 14: 115-119

Cantini M, Cossarizza A, Bersani F, Cadossi R, Ceccherelli G, Tenconi R, Gatt C, Franceschi C (1987): Enhancing effects of pulsed electromagnetic fields on lectin-induced human lymphocyte proliferation. *J. Bioelectric.* 5: 91-104

Chaney MP, Demarco PV, Jones ND, Occolowitz JL (1974): The structure of A23187, a divalent cation ionophore. *J. Am. Chem. Soc.* 96: 932-934

Chiabrera A, Giannetti G, Grattarola M, Parodi M, Carlo P, Finollo R (1985): The role of ions in modifying chromatin structure. *Reconstr. Surg. Traumatol.* 19: 51-62

Cohen MM, Kunska A, Astemborski JA, McCulloch D, Paskewitz DA (1986): Effect of low-level, 60-Hz electromagnetic fields on human lymphoid cells: I. Mitotic rate and chromosome breakage in human peripheral lymphocytes. *Bioelectromagnetics* 7: 415-423

Cohen MM, Kunska A, Astemborski JA, McCulloch (1986): The effect of low-level 60-Hz electromagnetic fields on human lymphoid cells. II. Sister-chromatid exchanges in peripheral lymphocytes and lymphoblastoid cell lines. *Mutat. Res.* 172: 177-184

Cohen SM, Ellwein LB (1990): Cell proliferation in carcinogenesis. *Science* 249: 1007-1011

Conti P, Gigante GE, Cifone MG, Alesse E, Ianni G, Reale M, Angeletti PU (1983): Reduced mitogenic stimulation of human lymphocytes by extremely low frequency electromagnetic fields. *FEBS Lett.* 3 162: 156-60

Conti P, Gigante GE, Alesse E, Cifone MG, Fieschi C, Reale M, Angeletti PU (1985): A role for Ca^{2+} in the effect of very low frequency electromagnetic field on the blastogenesis of human lymphocytes. *FEBS Lett.* 181: 28-32

Cossarizza A, Monti D, Sola P, Moschini G, Cadossi R, Bersani F, Franceschi C (1989): DNA repair after gamma irradiation in lymphocytes exposed to low-frequency pulsed electromagnetic fields. *Radiat. Res.* 118: 161-168

D'Ambrosio G, Scaglione A, Berardino DD, Lioi MB, Iannuzzi L, Mostacciuolo E, Scarfi MR (1985): Chromosomal aberrations induced by ELF electric fields. *J. Bioelectric.* 4: 279-284

Demers PA, Thomas DB, Rosenblatt KA, Jimenes LM, McTieman A, Stalsberg H, Stemhagen A, Thompson WD, Curnen MG, Satariano W (1991): Occupational exposure to electromagnetic fields and breast cancer in men. *Am. J. Epidemiol.* 134: 340-347

Dornand J, Gerber M (1989): Inhibition of murine T-cell responses by anti-oxidants: the targets of lipo-oxygenase pathway inhibitors. *Immunology* 68: 384-391

Eichwald C, Walleczek J (1996): Activation-dependent and biphasic electromagnetic field effects: model based on cooperative enzyme kinetics in cellular signaling. *Bioelectromagnetics* 17: 427-435

Eichwald C, Walleczek J (1996): Model for magnetic field effects on radical pair recombination in enzyme kinetics. *Biophys. J.* 71: 623-631

Eichwald C, Walleczek J (1997): Low-frequency-dependent effects of oscillating magnetic fields on radical pair recombination in enzyme kinetics. *J. Chem. Phys.* 107: 4943-4950

Fatt P, Ginsborg BL (1958): *J. Physiol.* 142: 516-543

Feychtin M, Ahlbom A (1993): Magnetic fields and cancer in children residing near Swedish high-voltage power lines. *Am. J. Epidemiol.* 138: 467-481

Feychting M, Forssen U, Rutqvist LE, Ahlbom A (1998): Magnetic fields and breast cancer in Swedish adults residing near high-voltage power lines. *Epidemiology* 9: 392-397

- Feychting M, Ahlbom A, Savitz D (1998): Electromagnetic fields and childhood leukemia. *Epidemiology* 9: 225-226
- Floderus B, Persson T, Stenlund C, Wennberg A, Ost A, Knave B (1993): Occupational exposure to electromagnetic fields in relation to leukemia and brain tumors: a case-control study in Sweden. *Cancer Causes Control* 4: 465-476
- Fulton JP, Cobb S, Prble L (1980): Electrical wiring configurations and childhood leukemia in Rhode island. *Am. J. Epidemiol.* 111: 292-296
- Galo MG, Unates LE, Farias RN (1981): Effect of membrane fatty acid composition on the action of thyroid hormones on (Ca²⁺ + Mg²⁺)-adenosine triphosphatase from rat erythrocyte. *J. Biol. Chem.* 256. 7113-7114
- Gollnick F (1992): Aufbau eines Messplatzes und fluometrische Untersuchungen mit Fura-2 zur Verteilung und regulatorischen Funktion von Calciumionen in lebenden Amöben. *Promotionsschrift Univeristät Bonn*
- Grissom CB (1995): Magnetic field effects in biology: a survey of possible mechanisms with emphasis on radical pair recombination. *Chem. Rev.* 95: 3-24
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985): A new generation of Ca²⁺-indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Cem.* 260: 3440-3450
- Hand DJ, Taylor CC (1987): Multivariate analyses of of variance and repeated measures. Chapman and Hall, London
- Hill A, Wilff S (1982): Increased induction of sister chromatid exchanges by diethylstilbestrol in lymphocytes from pregnant and premenopausal women. *Cancer Res.* 42: 893-896
- Hokin, LE, Hokin MR (1958): *Biol.Chem.*233: 805-810

Hokin MR, Hokin LE (1967): The Na⁺, and Cl⁻ content of goose salt gland slices and the effects of acetylcholine and ouabain. *Gen. Physiol.* 50: 793-811

IARC classification of static and extremely low frequency electric and magnetic fields (volume 80 of the IARC monographs series). *J. Radiol. Prot.* 1: 313-314

Ivancsits S, Diem E, Pilger A, Rüdiger HW, Jahn O Induction of DNA strand breaks by intermittent exposure to extremely-low-frequency electromagnetic fields in human diploid fibroblasts. *Mutat. Res.* 519: 1-13

Janis RA, Scriabine A (1983): Sites of action of Ca²⁺ channel inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* 32: 3499-3507

Jarrett HW, Penniston JT (1977): Partial purification of the Ca²⁺-Mg²⁺ ATPase activator from human erythrocytes: its similarity to the activator of 3':5' - cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77: 1210-1216

Kay JE (1971): Interaction of lymphocytes and phytohaemagglutinin: inhibition by chelating agents. *Exp. Cell. Res.* 68: 11-6

Khalil AM, Qassem W (1991): Cytogenetic effects of pulsing electromagnetic field on human lymphocytes in vitro: chromosome aberrations, sister-chromatid exchanges and cell kinetics. *Mutat. Res.* 247: 141-146

Kieback D (1990): Wirkungen elektromagnetischer Felder auf den Menschen. *Wissenschaft und Umwelt* 1: 11-24

Kirschvink JL, Kobayashi Kirschvink A, Woodford BJ (1992): Magnetite biomineralization in the human brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 7683-7687

Kirschvink JL, Kobayashi Kirschvink A, Diaz Ricci JC, Kirschvink SJ (1992): Magnetite in human tissues: a mechanism for the biological effects of weak ELF magnetic fields. *Bioelectromagnetics Suppl.* 1: 101-113

Kokubun S, Reuter H (1984): Dihydropyridine derivatives prolong the open state of Ca channels in cultured cardiac cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 4824-4827

Kostyuk PG (1981): Calcium channels in the neuronal membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 650: 128-150

Lai H, Singh NP (1997): Acute exposure to a 60 Hz magnetic field increases DNA strand breaks in rat brain cells. *Bioelectromagnetics* 18: 156-165

Lee KS, Tsien RW (1983): Mechanism of calcium channel blockade by verapamil, D600, diltiazem and nitrendipine in single dialysed heart cells. *Nature* 302: 790-794

Lednev VV (1991): Possible mechanism for the influence of weak magnetic fields on biological systems. *Bioelectromagnetics* 12: 71-75

Leitgeb N (1990): *Strahlen, Wellen, Felder*. Thieme-Verlag, Stuttgart, pp 1-130

Lerchl A, Nonaka KO, Reiter RJ (1991): Pineal gland "magnetosensitivity" to static magnetic fields is a consequence of induced electric currents (eddy currents). *J. Pineal. Res.* 10: 109-116

Liboff AR, McLeod BR, Smith SD (1990): Ion cyclotron resonance effects of ELF fields in biological systems, in Wilson BW, Stevens RG, Anderson LE (Eds.): *Extremely low frequency electromagnetic fields: the question of cancer*. Batelle Press, Columbus, OH pp251-289

Liburdy RP (1992): Calcium signaling in lymphocytes and ELF fields. Evidence for an electric field metric and a site of interaction involving the calcium ion channel. *FEBS Lett.* 301: 53-59

Lichtman AH, Segel GB, Lichtman MA (1979): An ultrasensitive method for the measurement of human leukocyte calcium: lymphocytes. *Clin. Chim. Acta* 97: 107-121

Lichtman AH, Segel GB, Lichtman MA (1980): Total and exchangeable calcium in lymphocytes: effects of PHA and A23187. *J. Supramol. Struct.* 14: 65-69

Lindström E, Lindström P, Berglund A, Lundgren E, Mild KH (1995): Intracellular calcium oscillations in a T-cell line after exposure to extremely-low-frequency magnetic fields with variable frequencies and flux densities. *Bioelectromagnetics* 16: 41-47

Lindström E, Berglund A, Mild KH, Lindström P, Lundgren E (1995): CD45 phosphatase in Jurkat cells is necessary for response to applied ELF magnetic fields. *FEBS Lett.* 370: 118-22

Litovitz TA, Krause D, Mullins JM (1991): Effect of coherence time of the applied magnetic field on ornithine decarboxylase activity. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 178: 862-865

Litovitz TA, Montrose CJ, Wang W (1992): Dose-response implications of the transient nature of electromagnetic-field-induced bioeffects: theoretical hypotheses and predictions. *Bioelectromagnetics Suppl* 1: 237-246

Löscher W, Mevissen M, Lehmacher W, Stamm A (1993): Tumor promotion in a breast cancer model by exposure to a weak alternating magnetic field. *Cancer Lett.* 71: 75-81

Löscher W, Wahnschaffe U, Mevissen M, Lerchl A, Stamm A (1994): Effects of weak alternating magnetic fields on nocturnal melatonin production and mammary carcinogenesis in rats. *Oncology* 51: 288-295

Löscher W, Mevissen M (1995): Linear relationship between flux density and tumor co-promoting effect of prolonged magnetic field exposure in a breast cancer model. *Cancer Lett.* 96: 175-180

Maly FE (1990): The B lymphocyte: a newly recognized source of reactive oxygen species with immunoregulatory potential. *Free Radic. Res. Commun.* 8: 143-148

McCann J, Dietrich F, Rafferty C, Martin AO (1993): A critical review of the genotoxic potential of electric and magnetic fields. *Mutat. Res.* 297: 61-95

McCann J, Dietrich F, Rafferty C (1998): The genotoxic potential of electric and magnetic fields: an update. *Mutat. Res.* 411: 45-86

McLeod BR, Liboff AR, Smith SD (1992): Electromagnetic gating in ion channels. *J. Theor. Biol.* 158: 15-31

Merritt JE, Jacob R, Hallam TJ (1989): Use of manganese to discriminate between calcium influx and mobilization from internal stores in stimulated human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 264: 1522-1527

Mevissen M, Stamm A, Buntenkotter S, Zwingelberg R, Wahnschaffe U, Löscher W (1993): Effects of magnetic fields on mammary tumor development induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in rats. *Bioelectromagnetics* 14: 131-143

Mevissen M, Kietzmann M, Löscher W (1995): In vivo exposure of rats to a weak alternating magnetic field increases ornithine decarboxylase activity in the mammary gland by a similar extent as the carcinogen DMBA. *Cancer Lett.* 90: 207-214

Mevissen M, Lerchl A, Löscher W (1996): Study on pineal function and DMBA-induced breast cancer formation in rats during exposure to a 100-mG, 50 Hz magnetic field. *J. Toxicol. Environ. Health* 48: 169-185

Mevissen M, Lerchl A, Löscher W (1996): Exposure of DMBA-treated female rats in a 50-Hz, 50 microTesla magnetic field: effects on mammary tumor growth, melatonin levels, and T lymphocyte activation. *Carcinogenesis* 17: 903-910

Michell RH (1975): Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim. Biophys. Acta* 415: 81-147

Milham SJ (1982): Mortality from leukemia in workers exposed to electrical and magnetic fields. *N. Engl. J. Med.* 307: 249

Milham SJ (1988): Increased mortality in amateur radio operators due to lymphatic and hematopoietic malignancies. *Am. J. Epidemiol.* 127: 50-54

Mooney NA, Smith RE, Watson BW (1986): Effect of extremely-low-frequency pulsed magnetic fields on the mitogenic response of peripheral blood mononuclear cells. *Bioelectromagnetics* 7: 387-394

Murphy JC, Kaden JW, Sivak A (1993): Power frequency electric and magnetic fields: a review of genetic toxicology. *Mutat. Res.* 296: 221-240

Nordenson I, Mild KH, Andersson G, Sandstrom M (1994): Chromosomal aberrations in human amniotic cells after intermittent exposure to fifty hertz magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 15: 293-301

Nordenson I, Mild KH, Järventaus H, Hirvonen A, Sandström M, Wilén J, Blix N, Norppa H (2001): Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of train engine drivers. *Bioelectromagnetics* 22. 306-315

Nordström S, Birke E, Gustavsson L (1983): Reproductive hazards among workers at high voltage substations. *Bioelectromagnetics* 4: 91-101

Nossol B, Buse G, Silny J (1993): Influence of weak static and 50 Hz magnetic fields on the redox activity of cytochrome-C oxidase. *Bioelectromagnetics* 14: 361-372

Papatheofanis FJ (1990): Use of calcium channel antagonists as magnetoprotective agents. *Radiat. Res.* 122: 24-28

Reed PW, Lardy HA (1972): A23187: a divalent cation ionophore. *J. Biol. Chem.* 247: 6970-6974

Reiter RJ (1995): Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J.* 9: 526-533

Repacholi MH, Greenebaum B (1999): Interaction of static and extremely low frequency electric and magnetic fields with living systems: health effects and research needs. *Bioelectromagnetics* 20: 133-160

Reuter H, Stevens CF, Tsien RW, Yellen G (1982): Properties of single calcium channels in cardiac cell culture. *Nature* 297: 501-504

Reuter H (1985): A variety of calcium channels. *Nature* 316: 391

Rose RC, Bode AM (1993): Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate. *FASEB J.* 7: 1135-1142

Rosenthal M, Obe G (1989): Effects of 50-Hertz electromagnetic fields on proliferation and on chromosome alterations in human peripheral lymphocytes untreated or pretreated with chemical mutagens. *Mutat. Res.* 210: 329-335

Salikhov KM, MolinYN, Sagdeev RZ (Ed.): Spin polarization and magnetic effects in radical reactions. *Studies in physical and theoretical chemistry* 22. Amsterdam. Elsevier.

Savitz AD, Wachtel H, Barnes FA, John EM, Tvrdik JG (1988): Case-control study of childhood cancer and exposure to 60-Hz magnetic fields. *Am. J. Epidemiol.* 128: 21-38

Savitz DA, Ahlbom A (1994): Power lines, viruses, and childhood leukemia. *Cancer Causes Control* Nov 5: 579-580

Scaiano JC, Cozens FL, McLean J (1994): Model for the rationalization of magnetic field effects in vivo. Application of the radical-pair mechanism to biological systems. *Photochem. Photobiol.* 59: 585-589

Scaiano JC, Mohtat N, Cozens FL, McLean J, Thansandote A (1994): Application of the radical pair mechanism to free radicals in organized systems: can the effects of 60 Hz be predicted from studies under static fields? *Bioelectromagnetics* 15: 549-554

Scarfi MR, Lioi MB, Zeni O, Franceschetti G, Franceschi C, Bersani F (1994): Lack of chromosomal aberration and micronucleus induction in human lymphocytes exposed to pulsed magnetic fields. *Mutat. Res.* 306: 129-133

Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA (1991): Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 10: 2247-2258

Segel GB, Simon W, Lichtman MA (1979): Regulation of sodium and potassium transport in phytohemagglutinin-stimulated human blood lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 64: 834-837

Segel GB, Kovach G, Lichtman MA (1979): Sodium-potassium adenosine triphosphatase activity of human lymphocyte membrane vesicles: kinetic parameters, substrate specificity, and effects of phytohemagglutinin. *J. Cell. Physiol.* 100: 109-117

Stevens RG, Davis S, Thomas DB, Anderson LE, Wilson BW (1992): Electric power, pineal function, and the risk of breast cancer. *FASEB J.* 6: 853-860

Stevens RG, Davis S (1996): The melatonin hypothesis: electric power and breast cancer. *Environ. Health. Perspect* 104 Suppl. 1: 135113-40

Streb H, Bayerdörffer E, Haase W, Irvine RF, Schulz I (1984): Effect of inositol-1,4,5-trisphosphate on isolated subcellular fractions of rat pancreas. *J. Membr. Biol.* 81: 241-253

Takehashi K, Kaneko I, Date M, Fukada E (1987): Influence of pulsing electromagnetic field on the frequency of sister-chromatid exchanges in cultured mammalian cells. *Experientia* 43: 331-332

Tenforde TS (1986): Thermoregulation in rodents exposed to high-intensity stationary magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 7: 341-346

Tomenius L (1986): 50-Hz electromagnetic environment and the incidence of childhood tumors in Stockholm. *Bioelectromagnetics* 7. 191-207

Triber MM, Morozov AK, Leksin AN (1986): Magnetic modulation of the chemiluminiscence intensity in the oxidation of lumine by potassium ferricyanide. *Kokl. Akad. Nat. SSSR* 284: 1170-1174

Trump BF, Berezesky IK (1995): Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J.* 9: 219-228

Trump BF, Berezesky IK (1995): Calcium, cell death, and tumor promotion. *Prog. Clin. Biol. Res.* 391: 121-131

Tsien RY, Pozzan T, Rink TJ (1982): T-cell mitogens cause early changes in cytoplasmic free Ca^{2+} and membrane potential in lymphocytes. *Nature* 295: 68-71

Tsien RW, Tsien RY (1990): Calcium channels, stores, and oscillations. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 6: 715-760

Valberg PA, Kavet R, Rafferty CN (1997): Can low-level 50/60 Hz electric and magnetic fields cause biological effects? *Radiat. Res.* 148: 2-21

Vijayalaxmi, Reiter RJ, Sewervnek E, Poeggeler B, Leal BZ, Meltz ML (1995): Marked reduction of radiation-induced micronuclei in human blood lymphocytes pretreated with melatonin. *Radiat. Res.* 143: 102-106

Walleczek J, Liburdy RP (1990): Nonthermal 60 Hz sinusoidal magnetic-field exposure enhances $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in rat thymocytes: dependence on mitogen activation. *FEBS Lett.* 271: 157-160

Walleczek J (1992): Electromagnetic field effects on cells of the immune system: the role of calcium signaling. *FASEB J.* 6: 3177-3185

Walleczek J, Budinger TF (1992): Pulsed electric field effects on calcium signaling in lymphocytes: dependence on cell status and field intensity. *FEBS Lett.* 314: 351-355

Walleczek J (1994): Immune cell interactions with extremely low frequency magnetic fields: experimental verification and free radical mechanisms, in: AH Frey (Ed.), On the nature of electromagnetic field interactions with biological systems. Springer-Verlag, New York, pp 167-180

Walleczek J (1995): Magnetokinetic effects on radical pairs: a paradigm for magnetic field interactions with biological systems at lower than thermal energy, in Blank M (Ed.), Electromagnetic fields: biological interactions and mechanisms. Advances in Chemistry 250. Washington, DC: American Chemical Society, pp 395-420

Weller A, Nolting F, Staerk H (1983): A quantitative interpretation of the magnetic field effect on hyperfine-coupling-induced triplet formation from radical ion pairs. Chem. Phys. Lett. 96: 24-27

Wertheimer N, Leeper E (1979): Electrical wiring configurations and childhood cancer. Am. J. Epidemiol. 109: 273-284

Whitney RB, Sutherland RM (1979): Effects of chelating agents on the initial interaction of phytohemagglutinin with lymphocytes and the subsequent stimulation of amino acid uptake. Biochim. Biophys. Acta 298: 790-797

Whitney RB, Sutherland RM (1979): Characteristics of calcium accumulation by lymphocytes and alterations in the process induced by phytohemagglutinin. J. Cell. Physiol. 82: 9-20

DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Obe, der es mir ermöglichte, diese Arbeit zu erstellen und mir jederzeit mit Geduld und guten Ratschlägen zur Seite stand.

Herrn Koops (KEMA, Arnhem, NL) danke ich für die Vergabe des Forschungsauftrags, der die Grundlage für diese Arbeit darstellte.

Ganz herzlich möchte ich Herrn Dr. Walleczek (Stanford University, USA) für seine Einladung und die Möglichkeit danken, Versuche über den Ca^{2+} -Influx in seinem Labor durchführen zu dürfen.

Herzlich danken möchte ich Herrn Dr. Heller (Forschungsgesellschaft Rauchen und Gesundheit mbH, Berlin), für dessen Hilfsbereitschaft und Geduld beim Erklären der Statistik.

Mein Dank gilt auch den Herren PD Dr. Meyer und Dr. Gollnick (Universität Bonn), die mir in ihrem Labor die Möglichkeit zur Untersuchung der Calciumaufnahme in Zellen boten.

Herrn Prof. Brinkmann (Forschungsverbund: EMV biol. Systeme, Braunschweig) danke ich für die Bereitstellung der Befeldungsgeräte.

Herrn Andreas Wojtysiak (Universität Witten/Herdecke) danke ich für die stete Diskussionsbereitschaft und die Hilfe bei der Computerarbeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Cytogenetik für die freundliche Arbeitsatmosphäre und Diskussionsbereitschaft. Besonderer Dank gilt hierbei Frau Dr. Weißenborn, Frau Pieper und Frau Nadorf.

Sehr herzlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir mein Studium ermöglichten und mich während dieser Arbeit immer unterstützten.

Lebenslauf

Geburtsort: München
Geburtsdatum : 23.04.1961
Familienstand : ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung	: 09.67 - 05.80	Rudolf Steiner Schule Nürnberg Abschluß: Abitur
Studium	: 08.80 - 06.81	Sacramento City College (USA) Studienfächer: Englisch, Biologie
	11.81 - 01.85	Universität Regensburg Studienfach: Biologie (Vordiplom)
	05.85 - 02.89	Universität München Studienfach: Biologie Abschluß: Diplom Diplomarbeit bei Prof. Cleve (Humangenetik): "Cytogenetische Untersuchungen am Nasopharynx-Carcinom"
Berufspraxis	: 02.89 - 06.97	Wissenschaftliche Mitarbeiterin bei Prof. Obe an der Universität Essen (FB Biologie: Genetik) Im Rahmen dieser Tätigkeit Studienaufenthalt an der Universität Stanford (USA)
	09.97 - 10.98	Mitarbeiterin im Institut für Mobil- und Satellitenfunktechnik (IMST) in Kamp-Lintfort
	11.98 - 06.02	Wissenschaftliche Mitarbeiterin bei Dr. Sudhoff am St Elisabeth Hospital (HNO-Forschungslabor) in Bochum

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Einfluss elektromagnetischer Felder auf menschliche Lymphozyten“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Alexandra Antonopoulos befürworte.

Essen, 07.07.03

(Prof. Dr. G. Obe)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, 07.07.03

(Alexandra Antonopoulos)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, 07.07.03

(Alexandra Antonopoulos)